

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de iodoproteínas y iodoaminoácidos tiroideos en
glándulas humanas patológicas y animales experimentales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Garcilaso Riesco Almarza

Madrid, 2015

el 13.778

DE 611.43
R1E



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5312163932

TA 1456

ESTUDIO DE IODOPROTEINAS Y IODOAMINOACI-
DOS TIROIDEOS EN GLANDULAS HUMANAS PA-
TOLOGICAS Y ANIMALES EXPERIMENTALES

Tesis presentada para optar
al grado de DOCTOR EN
MEDICINA Y CIRUGIA por
el Licenciado GARCILASO
RIESCO ALMARZA.

Madrid, 1972.

A mi padre, "in memoriam"

El trabajo que aquí se presenta ha sido iniciado bajo la dirección científica del Dr. D. Joaquín Mouriz García, en la Sección de Estudios Tiroideos del Instituto "G. Marañón" del C.S.I.C. y continuado bajo la supervisión de la Dra. D^a Gabriella Morreale de Escobar.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Mouriz y a los Dres. Escobar, a los que debo mi iniciación en la investigación y sin cuya ayuda constante no se habría podido finalizar la presente tesis.

Agradezco, asimismo, la colaboración de las auxiliares de laboratorio Srtas. Durán, Palacios, Ruiz, Sánchez, y González, y también a todos los compañeros y compañeras de laboratorio.

Al Prof. Tamarit por su amabilidad en la presentación de esta tesis en la Facultad de Medicina de Madrid, expreso mi reconocimiento.

La realización del presente trabajo se ha hecho posible gracias a la continuada ayuda del C.S.I.C. por medio del Instituto G. Marañón, una beca de "Iniciación a la investigación" concedida por la Comisaria de Protección Escolar y otra posterior del "Plan de Formación de Personal Investigador" del Ministerio de Educación y Ciencia. También ha contribuido a la realización de la presente tesis una ayuda a la investigación concedida por la Seguridad Social.

INDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	7
INTRODUCCION	9
OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS DE LA PRE- SENTE TESIS	48
MATERIALES Y METODOS	57
I - ESTUDIOS REALIZADOS EN GLANDULAS HUMANAS	58
A - <u>Materiales</u>	58
B - <u>Métodos</u>	61
1) <u>Extracto salino (E.S.)</u>	61
2) <u>Purificación por cromatografía en columna de Sephadex G-200</u>	62
3) <u>Perconcentración de las proteínas</u>	65
4) <u>Técnicas inmunológicas</u>	65
4 _a) <u>Inmunodifusión de Ouchterlony</u>	66
4 _b) <u>Inmunoelectroforesis</u>	68
5) <u>Electroforesis en acetato de celulosa</u>	70
6) <u>Valoración de proteínas</u>	72

7) <u>Análisis en ultracentrífuga analítica (U.A.).</u>	
<u>Determinación del coeficiente de sedimentación,</u>	
<u>(C.S.)</u>	73
8) <u>Determinaciones de iodo</u>	76
a) <u>Valoración de I[*]</u>	76
a ₁) Contaje de I [*]	76
a ₂) Determinación de la composición porcentual	
en iodoaminoácidos tiroideos marcados con I [*] .	76
a ₃) Precipitación del I [*] con ácido tricloroacético	
(TCA)	80
b) <u>Valoración de I¹²⁷</u>	80
b ₁) Método general	80
b ₂) Determinación de I ¹²⁷ y PBI ¹²⁷ en plasmas ..	82
b ₃) Determinación de iodo en tiroides	83
b ₄) Determinación de iodo en dietas alimenticias	
para ratas	84
b ₅) Determinación de la cantidad de iodoaminoáci-	
dos tiroideos separados por cromatografía en	
papel	84
II - ESTUDIOS REALIZADOS EN ANIMALES EX-	
PERIMENTALES	86
A - <u>Materiales</u>	86
B - <u>Métodos</u>	88
a) <u>Separación de iodoproteínas en gradiente de</u>	
<u>sacarosa</u>	89
RESULTADOS Y COMENTARIOS	91
I - ESTUDIOS REALIZADOS EN GLANDULAS	
HUMANAS	92
A - <u>Generalidades</u>	92

B - <u>Bocios multinodulares tóxicos y carcinomas de tiroi-</u>	
<u>des</u>	94
1) <u>Distribución del I[*] entre diversos iodoaminoáci-</u>	
<u>dos y su relación con la iodación de la tiroglo-</u>	
<u>bulina</u>	94
2) <u>Estudio de las iodoproteínas solubles de las</u>	
<u>glándulas humanas descritas</u>	119
a) <u>Fraccionamiento en Sephadex G-200</u>	119
b) <u>Estudio inmunológico de los picos proteicos ais-</u>	
<u>lados en Sephadex G-200</u>	125
c) <u>Resultado de los análisis en ultracentrífuga aná-</u>	
<u>lítica</u>	126
d) <u>Resumen</u>	132
C - <u>Bocios congénitos</u>	134
1) <u>Por falta de incorporación del yoduro a com-</u>	
<u>puestos orgánicos tiroideos</u>	134
a) <u>Historia y pruebas clínicas</u>	134
b) <u>Métodos</u>	138
c) <u>Resultados</u>	138
1) <u>Distribución intratiroidea del I¹³¹</u>	138
2) <u>Fraccionamiento en Sephadex G-200 de las</u>	
<u>proteínas solubles tiroideas</u>	140
3) <u>Estudios en U.A. de las iodoproteínas solubles</u> .	145
d) <u>Resumen</u>	145
2) <u>Bocio congénito por defecto de síntesis de tiro-</u>	
<u>globulina</u>	149
a) <u>Historia y pruebas clínicas</u>	149
b) <u>Métodos</u>	154
c) <u>Resultados</u>	154

1) Distribución intratiroidea del I^{125} y del I^{127}	154
2) Fraccionamiento en Sephadex G-200 de las proteínas solubles	157
3) Estudio de las iodoproteínas solubles en U.A. ..	161
4) Electroforesis de las iodoproteínas solubles en acetato de celulosa	161
5) Estudios inmunológicos	163
6) Microscopía óptica y electrónica	165
d) <u>Resumen</u>	172
II - ESTUDIOS REALIZADOS EN ANIMALES EXPERIMENTALES	
A - <u>Generalidades</u>	177
B - <u>Situación metabólica periférica y niveles circulatorios de hormonas tiroideas</u>	177
C - <u>Captación y distribución intratiroidea del I^{131} y del I^{127}</u>	180
D - <u>Estudio de las iodoproteínas tiroideas solubles</u>	185
1) <u>Análisis en U.A.</u>	185
2) <u>Fraccionamiento en gradiente de sacarosa</u>	188
3) <u>Iodación de cada fracción purificada de las proteínas solubles de los dos grupos de ratas</u>	193
E - <u>Microscopía óptica</u>	195
F - <u>Resumen</u>	198
DISCUSION	201
I - TIROIDES HUMANOS	202
A - <u>Datos obtenidos en B.M.N. eumetabólicos, Ca.T., B. hipermetabólicos y B. congénito por falta de organificación del I^-</u>	202

1) <u>Composición en iodoaminoácidos</u>	202
2) <u>Proteínas solubles</u>	208
B - <u>Datos obtenidos en un bocio congénito por defecto</u> <u>de síntesis en tiroglobulina</u>	213
1) <u>Composición en iodoaminoácidos</u>	213
2) <u>Proteínas solubles</u>	215
3) <u>Estudios inmunológicos</u>	216
4) <u>Microscopía óptica y electrónica</u>	218
5) <u>Casos parecidos descritos en la bibliografía</u>	218
II - ANIMALES EXPERIMENTALES	224
III - CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA FORMACION DE HORMONAS IODADAS EN EL TIROIDES	234
A - <u>Factores fundamentales</u>	236
B - <u>Alteraciones en la disponibilidad de iodo oxidado</u> <u>en el tiroides</u>	245
CONCLUSIONES	250
BIBLIOGRAFIA	256

CLAVE DE ABREVIATURAS

BEA	-----	Butanol-etanol-anmoniaco
TCA	-----	Acido tricloroacético
E.S.	-----	Extracto soluble. Extracto salino
U.A.	-----	Ultracentrífuga analítica
C.S.	-----	Coeficiente de sedimentación
T.G.	-----	Tiroglobulina
BMN	-----	Bocio multinodular
Ca. T.	-----	Carcinoma de tiroides
SDS	-----	Dodecil sulfato sódico
TSH	-----	Hormona tirotrópica de la hipófisis
IT	-----	Iodo total
PBI	-----	Iodo ligado a proteínas
NEI	-----	Iodo no extraíble con butanol
rpm	-----	Revoluciones por minuto
D.O.	-----	Densidad óptica
Hb	-----	Hemoglobina
DPN	-----	Difosfo-piridin-nucleotido
TPN	-----	Trifosfo-piridin-nucleotido

T_4	-----	Tiroxina
T_3	-----	Triiodotironina
MIT	-----	Monoiodotirosina
DIT	-----	Diiodotirosina
Or	-----	Origen (material sin digerir)
I	-----	Iodo
I^-	-----	Ioduro
T_4^*	-----	Tiroxina marcada con radioiodo
T_3^*	-----	Triiodotironina marcada con radioiodo
MIT^*	-----	Monoiodotirosina marcada con radio- iodo
DIT^*	-----	Diiodotirosina marcada con radioiodo
Or^*	-----	Origen marcado con radioiodo
I^*	-----	Iodo radioactivo
I^{-*}	-----	Ioduro radioactivo
I^{127}	-----	Iodo estable
Pico A	-----	Primer pico eluido en la purificación de los E.S. en Sephadex G-200
Pico B	-----	Segundo pico eluido en la purificación de los E.S. en Sephadex G-200
Pico C	-----	Tercer pico eluido en la purificación de los E.S. en Sephadex G-200

INTRODUCCION

Está por ahora establecido que el tiroides de vertebrados superiores segrega a la sangre tres hormonas: una de ellas, la calcitonina está implicada en la regulación del metabolismo del calcio, es de naturaleza polipeptídica y su origen parecen ser las células parafoliculares ("C cells", light cells"), que en muchas especies están incorporadas en el tiroides. Las otras dos, que son las que nos van a ocupar aquí, son el producto de las células foliculares que circundan el coloide. Estas dos hormonas^{*} tienen una estructura muy parecida y, entre otras, las siguientes características: la presencia de átomos de iodo en la molécula, en posiciones orto con respecto al grupo hidroxilo y al puente de difenil-eter, un grupo hidroxilo ionizable y un puente difenil-eter. Para mejor comprensión del tema conviene recordar las fórmulas de dichas hormonas, y de sus precursores, iodados (Fig. 1, a).

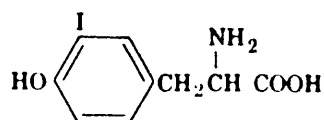
Casi desde que Harington y Barger en 1926, 1927 descubrieron la fórmula correcta de la hormona tetraiodada, la tiroxina, se inició una larga y fructífera serie de investigaciones encaminadas a ver cuáles son los requerimientos esenciales de su estructura sin los que se pierde la actividad biológica. Gracias a ella, se ha llegado a establecer que los requerimientos básicos son: la estructura de difenil-eter, un hidroxilo ioni-

* Cuando se habla de "hormona tiroidea" en el texto que sigue, se hace referencia a ambas a no ser que se especifique claramente otra cosa.

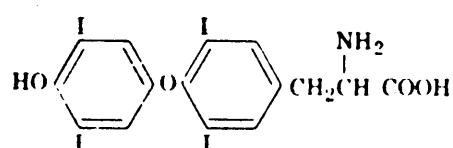
COMPUESTOS ORGANICOS DEL IODO EN EL TIROIDES



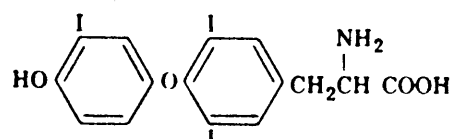
Diiodotirosina, DIT



Monoiodotirosina, MIT



**3,5,3',5', Tetraiodotironina,
Tiroxina ó T₄.**



3,5,3' Triiodotironina, T₃.

Figura nº 1, a.

Fórmulas de las hormonas tiroideas, Tiroxina (T₄) y Triiodotironina (T₃), con sus "precursores" iodados, Monoiodotirosina (MIT) y Diiodotirosina (DIT).

zable en posición para con respecto al puente de oxígeno, la presencia de dos átomos de halógeno en posición orto con respecto al puente de oxígeno y en el anillo α de la molécula, así como un sustituyente voluminoso en posición 3' del anillo β . Durante la última década se han obtenido derivados tiromiméticos que son incluso más activos que los naturales, y en los que no hay átomos alguno de yodo en el anillo β , pero sí hay dos átomos de I (o Br) en el anillo α . Ahora bien, aun no se ha podido dilucidar si la mayor o menor actividad tiromimética de distintos derivados sintéticos y naturales se deben a que, realmente, una molécula de uno de ellos induce un efecto mayor (o menor) que una molécula de otro, o es que usando diferentes derivados llega un mayor (o menor) número de moléculas al efecto celular. Lo que parece cierto por ahora es que la presencia de I (o al menos de Br) en posiciones específicas dentro de una estructura de difenil-éter confiere unas características únicas. Por qué? No se sabe. Una contestación a esta pregunta sería a la vez una respuesta al misterio que tanto sigue apasionando, el de cuál es el mecanismo de acción de estas hormonas.

Pero por el motivo que sea, durante millones de años de evolución la naturaleza ha ido perfeccionando un sistema por el cual se asegura en lo posible que no lleguen a faltar en el organismo estas hormonas que les son esenciales. Es opinión de muchos que la falta absoluta de esta hormona en vertebra-

dos sería incompatible con el mantenimiento de la vida. Pero aunque no se admitiese esto, todos están de acuerdo en que incluso una deficiencia intensa, aunque no absoluta, de esta hormona es incompatible con el desarrollo y comportamiento normales de los vertebrados. Esta dependencia del organismo debe pues tener ventajas adaptivas de la máxima importancia. Pero a la vez impone al organismo la resolución de problemas muy difíciles: al contrario de lo que sucede con las materias primas con las cuales se sintetizan los otros "mensajeros químicos" de un organismo animal, una de las materias primas de las hormonas del folículo tiroideo, el I, es un oligoelemento. O sea, es un elemento muy escaso en la naturaleza. Lo es sobre todo para los organismos cuya vida transcurre en totalidad o en parte fuera del medio acuático marino. Para complicar más la resolución del problema, además de muy escaso, el aporte en I puede ser muy variable.

Ahora bien, aunque no sepamos porqué a lo largo de millones de años la naturaleza no ha encontrado un medio para independizarse totalmente de la necesidad de utilizar I, y éste por lo tanto, sigue siendo elemento esencial para los organismos superiores, sí sabemos que ha encontrado la manera de aminorar al máximo los inconvenientes que acompañan a esta dependencia. Con el folículo tiroideo la evolución ha perfeccionado un sistema que permite: a) aprovechar al máximo las pequeñas cantidades de yodo que llegan al organismo desde el medio exterior, b) almacenar una considerable cantidad de hormonas iodadas durante los periodos en los que la asequibi-

lidad de I es superior a los requerimientos del organismo, en previsión de otras épocas en que, por fluctuaciones en el aporte de este elemento, la producción de hormonas se haría insuficiente y c) poder poner rápidamente en circulación la cantidad de hormonas necesitada en cada momento. Se debe recalcar aquí que el folículo tiroideo se distingue de otros tejidos con función endocrina en la siguiente importante característica: además de tener que perfeccionar los sistemas mediante los cuales se regula la secreción de hormona de tal forma que se satisfagan en cada momento los requerimientos del organismo, ha tenido que desarrollar otro por el cual siempre haya hormona disponible, sean cuales fueran las fluctuaciones en el aporte de las materias primas con que se sintetiza. Recuérdese que estas fluctuaciones no dependen del organismo y no pueden ser reguladas por éste. Toda la estructura del folículo tiroideo parece estar encaminada a proteger al máximo, dentro de él, a este elemento tan indispensable y precioso para los organismos superiores. Este mecanismo es tan eficiente, que en muchas especies animales el tiroides contiene hormona suficiente para cubrir los requerimientos del organismo durante semanas, aunque quedase interrumpido todo el nuevo aporte de I. Así se aumentan las posibilidades de superar sin graves consecuencias un pasajero déficit en el aporte de este elemento.

Considerando el proceso histórico por el cual se iniciaron nuestros conocimientos sobre el tiroides no es de extrañar que los primeros conocimientos sobre su hormona iodada

se efectuasen en animales en los que los folículos ya están organizados en forma de una glándula circunscrita. La falta de un conducto excretor externo se hizo evidente para esta glándula antes que para otras del sistema endocrino y no dejó de llamar la atención y despertar la curiosidad de los antiguos anatómicos y los primeros experimentadores. Ya en 1860 F. Ruysh había llegado a la conclusión de que esta glándula debía "verter algo a las venas", iniciando unos conceptos que lentamente fueron llevando a la comprensión de su función. Pero aunque los primeros estudios, experimentales y clínicos, que llevaron a esta comprensión se efectuasen en el hombre y en mamíferos superiores, sabemos actualmente que la estructura básica, el folículo tiroideo, aparece claramente definida en los ciclostomos y en procordados aparece una estructura "precursora" del folículo. No sólo embiológicamente, sino también filogenéticamente, se pueden reentrazar relaciones íntimas entre los folículos tiroideos y el tracto gastrointestinal. Como resume admirablemente Gorbman (1962), la habilidad de metabolizar el I e incorporarlo a numerosos compuestos orgánicos iodados no es una característica exclusiva del folículo tiroideo, sino una propiedad que se encuentra muy generalizada en el mundo animal y vegetal. "Precursores" de las hormonas iodadas del tiroides, como la mono y diiodotirosina (MIT y DIT), se encuentran en muchos animales invertebrados (moluscos, crustáceos, anélidos, insectos) e incluso en algas marinas. En invertebrados parece, sin embargo, que sólo raramente se ha podido encontrar tiroxina (T_4), y entonces solo en cantidades traza. En tipos de organización inver-

tebrada, las iodoproteínas que pueden contener iodoaminoácidos suelen encontrarse en estructuras fibrosas exoesqueléticas y en dientes faríngeos (Fig. 2, a). Actualmente se supone que, cuando este material (de fácil formación en un ambiente marino) empezó a tener algún valor adaptivo para el organismo, su origen ya era faríngeo. Se hidrolizaba luego en el tracto intestinal, en el que se absorbían los iodoaminoácidos hormonales allí liberados. Establecido el valor adaptivo de este proceso, se desarrolló aun más esta fuente ("dientes parafaríngeos") de compuestos iodados. También se observa este tipo faríngeo de organización en cefalocordados, como el *Amphioxus* (Fig. 2, a), en los que se ha identificado una cantidad apreciable de tiroxina (T_4) y triiodotironina (T_3) en no menos de cinco solventes cromatográficos. Pero la iodoproteína que en éstos se encuentra ya no es una escleroproteína, sino una proteína asociada a una actividad glandular exocrina, la del endostilo. Al parecer, al ser segregada hacia el tracto intestinal, las proteasas allí existentes serían las que dejarían en libertad las hormonas. Lo mismo se observa en el *Ammocoetes*, forma larval de la lamprea (un ciclostomo). Pero en éste se observa ya un considerable avance evolutivo: durante su metamorfosis el tejido glandular que circunda al endostilo (y en el que se forman las iodoproteínas) se hace independiente del tracto gastrointestinal, puesto que se cierra el conducto por el que se comunicaban en la forma larval. Al ocurrir esto, para la liberación de la hormona iodada a partir de las iodoproteínas, tiene que desarrollarse una proteasa que ya no sea intestinal, sino segregada en el endostilo

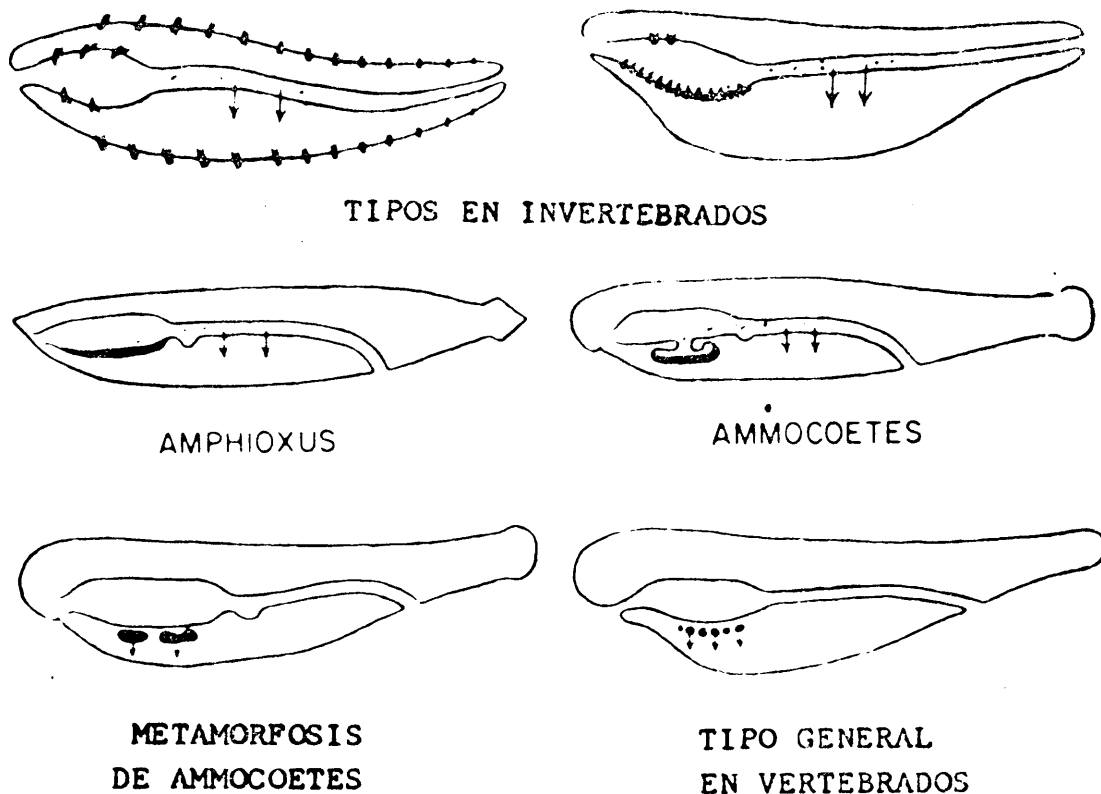


Figura nº 2, a.

Evolución filogenética de las estructuras capaces de formar hormonas tiroideas. En invertebrados solo se han encontrado trazas de tiroxina, obtenida por hidrólisis de escleroproteínas y de estructuras fibrosas exoesqueléticas (arriba izquierda) y dientes parafaríngeos (arriba derecha). En amphioxus predomina ya la organización faríngea con función glandular exocrina, que segrega una iodoproteína en cantidades apreciables, que se hidroliza en el tubo digestivo donde se reabsorben T_4 y T_3 . Esto ocurre también en el ammocoetes (forma larval de la lamprea), pero durante su metamorfosis se cierra esta comunicación, en la forma adulta, y la hidrólisis de la iodoproteína se hace en el endostilo mismo.

Esta es ya el tipo general que se encuentra en los demás vertebrados.

mismo. Vemos pues que en la lamprea adulta aparecen ya las características de secreción interna típicas del folículo tiroideo, y de los demás vertebrados. En los vertebrados inferiores, los folículos pueden estar diseminados y no organizados en una glándula anatómicamente bien delimitada. Pero a partir de los peces cartilaginosos y en algunos teleósteos ya se observa una organización glandular que en esencia es igual a la de los tetrápodos. Filogenéticamente, pues, el "precursor" del folículo tiroideo, tal y como lo conocemos en mamíferos superiores, se distingue por una iodoproteína que se almacena en un recinto, en el que tiene lugar su proteólisis, necesaria para que se puedan segregar al organismo T_4 y T_3 libres. En todos los vertebrados se encuentra ya una hormona de la hipófisis que controla la velocidad con que se segregar las hormonas iodadas, y es muy probable que en todos ellos este control se ejerza a nivel de la proteólisis de la iodoproteína.

Qué ocurre en el folículo tiroideo de los vertebrados, que permite la eficiente realización de los procesos a), b) y c) a los que antes se ha hecho referencia? En los libros de texto y consulta de las últimas décadas es habitual presentar esquemas que "ilustren" las diferentes fases del metabolismo del iodo en un folículo normal. La mayoría de estos esquemas contienen mayor o menor detalle y son más o menos artísticos e intuitivos (Fig. 3, a), pero en esencia ponen de manifiesto los siguientes "pasos" que a continuación se describen muy someramente;

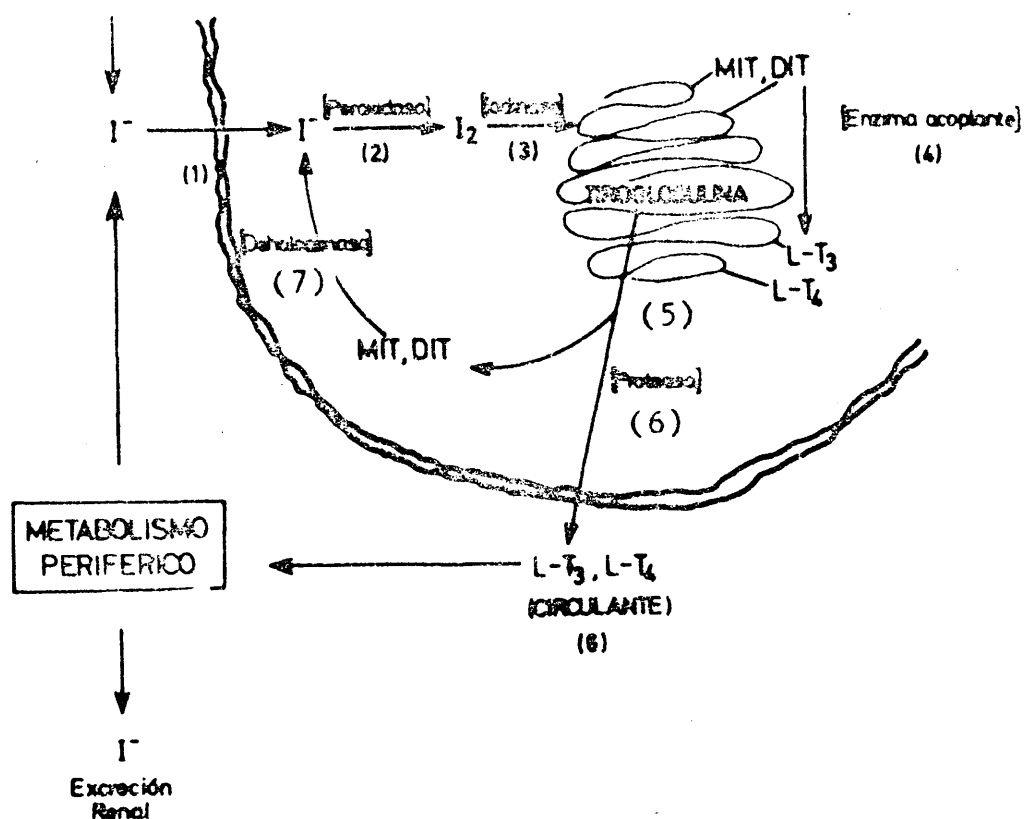


Figura nº 3, a.

Fases por las que atraviesa el I^- desde su circulación por la sangre hasta que es de nuevo vertido a ella en forma de hormonas iodadas. Se han representado deliberadamente todos los enzimas reales y supuestos que intervendrían en este proceso. La explicación somera de cada una de estas fases se detalla en el texto.

Fase 1). El iodo, que circula como ioduro en la sangre, llega a la célula folicular y es "captado" ("atrapado, bombeado") por ella hacia el lumen folicular. En realidad sólo deberíamos decir que es "transportado", hasta que podamos definir con más exactitud de qué tipo de fenómeno se trata. Pero gracias a él, puede encontrarse en el folículo una concentración de I^- muy superior a la que se encuentra en el plasma. El proceso tiene muchas de las características de un transporte activo y se están acumulando pruebas de que está implicado en este proceso un componente lipídico, del tipo de las lecitinas. Dicho proceso se inhibe mediante ClO_4^- , SCN^- , otros aniones, y numerosos factores.

Fase 2). Si no hay alguna interferencia en el proceso 1), el I^- es oxidado a una forma aun no identificada, que para simplificar llamaremos "iodo oxidado" o en forma oxidante. Es indudable que en el tiroides hay un sistema capaz de oxidar el I^- a este estado (I^+ , I_2 ?). Esta reacción requiere un potencial red-ox bastante elevado. Por eso, en muchos esquemas se indica que esta reacción requiere una peroxidasa. En algunos se indica que es a este nivel donde actuarían muchos antitiroideos del tipo de los tiouracilos, tioureas, etc., pues todos ellos impiden que se forme "iodo oxidante". En otros esquemas, se indica que estos compuestos inducirían un bloqueo en los muy hipotéticos "pasos" 3) ó 4).

Fase 3). Una vez oxidado el I, se incorpora rápidamente

a radicales tirosilo, formándose moniodotirosina (MIT) y diiodotirosina (DIT). En muchos esquemas se indica que esta incorporación requiere una "iodasa" o "iodinasa", o un "sistema iodante". En algunos, se implica que para la formación de MIT no se requiere un enzima especial pero sí para la de DIT. Haremos ulteriores referencias sobre estas suposiciones, de muy poca base experimental.

Fase 4). Una vez formadas la MIT y DIT, en la mayoría de los esquemas ya no se suele adjudicar al "iodo oxidado" un ulterior papel en el proceso de la biosíntesis de T_4 y T_3 . Estas dos hormonas se formarían por el "acoplamiento" de dos moléculas de DIT (para la formación de T_4) con pérdida de una cadena lateral de dehidroalanina o por "acoplamiento" de MIT y DIT (para formar T_3). En algunos esquemas se indica que este paso requiere un enzima acoplante; en otros, que hay un "sistema" acoplante. Al igual que en el caso de la "iodinasa", se hará ulterior referencia a este hipotético enzima.

Fase 5). En la mayoría de los esquemas se hace alguna referencia, más o menos vaga, a que los aminoácidos que intervienen en las reacciones resumidas en 2), 3) y 4) están incorporados por enlace peptídico en una proteína. Esta, la tiroglobulina (T.G.), sería la forma en que se almacenan dichos iodoaminoácidos en el tiroides.

Fase 6). Las hormonas del tiroides circulan en sangre y pueden detectarse ya en la vena tiroidea como aminoácidos libres; en sangre circulan ligados por enlaces débiles a proteínas plasmáticas, pero no están incorporados en una proteína por enlaces peptídicos. Por tanto, en estos esquemas se indica que es necesario un proceso proteolítico, mediante el cual se destruye la proteína que contiene MIT, DIT, T_3 y T_4 . Solo así pueden pasar estas dos últimas a la sangre. Suele indicarse asimismo que este proceso es sumamente sensible a la hormona tirotrópica y a otros estimuladores tiroideos, de los cuales el más conocido es el LATS (long acting thyroid stimulator) que se encuentra en el plasma de algunos individuos con enfermedad de Graves.

Fase 7). En la sangre efluyente de la vena tiroidea sólo se encuentran las dos hormonas, T_4 y T_3 . En condiciones normales no se encuentran MIT y DIT. Estas son desiodadas dentro del tiroides, y el I que queda libre vuelve a utilizarse en su mayor parte, reincorporándose en el ciclo en la fase 2) (o la 3?). Todos los esquemas indican que interviene la deshalogenasa o desiodasa de las iodotirosinas, enzima que sólo actuaría sobre éstos cuando están en forma de iodoaminoácidos libres pero no si están aun incorporados en la T. G. Este paso es de gran importancia, pues la reutilización del I procedente de las iodotirosinas representa una importante economía de este elemento tan escaso.

Qué base hay para resumir en esquemas de este

tipo las reacciones mediante las cuales el folículo tiroideo lleva a cabo su función de sintetizar, almacenar y segregar hormonas iodadas? No se va a hacer aquí una revisión crítica exhaustiva de todos los problemas relacionados con las distintas fases resumidas en los esquemas clásicos pues llevaría varios libros y muchos años; sólo se van a hacer algunos comentarios que parecen pertinentes, y que no se han hecho aun de forma explícita. Referimos al lector interesado por mayores detalles a varias magníficas revisiones más o menos recientes (Taurog, 1964; Pitt-Rivers and Troter, 1964; Barrington, 1964; Turner, 1965; Gorbman, 1962; Ingbar y col. 1968; Wolff, 1970).

Por lo que respecta a la reacción de "transporte" del I^- , no hay duda de que la célula tiroidea tiene la propiedad de concentrar este elemento. Pero es esta una característica única y específica de las células del folículo tiroideo? No lo es. Es interesante que en peces teleósteos marinos que pasan parte de su vida en aguas dulces (por ejemplo, trucha, salmón), ya hay un sistema en la sangre que es capaz de ligar I^- y mantenerlo a una concentración superior a la del agua en la que viven, con lo que tienen ya una reserva extratiroidea de iodo en previsión de la fase de su vida que transcurre en aguas dulces. En animales filogenéticamente aun más antiguos, como la lamprea marina, esta función la tiene el notocordio, que concentra grandes cantidades de ioduro. Este proceso también se afecta con SCN^- , como el de los folículos tiroideos. En muchos peces el ovario concentra canti-

dades ingentes de ioduros, y, debido a la enorme masa que pueden adquirir éstos, llegan a ser los ovarios los que contienen la mayor parte del iodo del organismo. Pero incluso en vertebrados superiores, está claramente demostrado que tejidos del mismo origen embionario que el tiroides (como las glándulas salivares y la mucosa gástrica) concentran ioduro. También lo hacen la placenta, el ovario y la glándula mamaria, sobre todo la lactante. Y aunque haya diferencias en algunos aspectos de estos procesos de concentración de I^- , al compararlos en el que se ha estudiado en el tiroides, las semejanzas son asimismo muy notables. Creemos que puede decirse, pues, que el "transporte" o "captación" de ioduro por el tiroides, no es un proceso que caracterice de forma singular al folículo tiroideo.

En realidad lo mismo podría decirse de la serie de "pasos", que suelen describirse por separado resumidos aquí como fase 2), 3) y 4). En este respecto se quiere resaltar que, si quitamos toda referencia a los supuestos enzimas implicados en las diversas fases, el esquema que va de la fase 2) a la 5) es el fruto de haber trasladado al folículo tiroideo unas reacciones que se habían estudiado in vitro, en sistemas que no contenían folículos o células tiroideas. Creemos que es interesante extendernos un poco en ésto para comprender mejor la gran novedad que suponen los cambios en nuestros conceptos que están teniendo lugar en los últimos 5 años, y a los que se va a hacer amplia referencia más adelante. En 1914 Kendall consiguió cristalizar T_4 , siguiendo

los brillantes estudios iniciados por Bauman (1895) pocos meses antes de su fallecimiento, y en los que éste había demostrado la presencia de iodo en forma orgánica dentro del tiroides de los mamíferos. Para este proceso Kendall tuvo que hidrolizar primero las iodoproteínas del tiroides. Con ello confirmó la observación de Oswald (1899), de que el iodo del tiroides estaba incorporado en una proteína característica, que él definió y llamó tiroglobulina. Pero Kendall no tuvo cantidad de tiroxina suficiente para un análisis de su estructura con los métodos de que se disponía entonces. Sólo tuvo bastante cantidad para determinar el análisis elemental, y se equivocó en la fórmula estructural que propuso. Harington (1926), tras perfeccionar la técnica de Kendall y obtener inicialmente cantidades suficientes de T_4 a partir de tiroides de animales, realizó luego gran parte de sus fundamentales y brillantes estudios sobre esta hormona sin volver a usar un tiroides. Determinó la estructura de la hormona y verificó su síntesis orgánica completa. Conocida y confirmada por síntesis la fórmula de la T_4 y habiendo demostrado que el producto así obtenido era tan activo biológicamente como el obtenido a partir de tiroides, Harington propuso una hipótesis sobre el posible mecanismo de la formación in vivo de la T_4 (Fig. 4, a): se formaría por "acoplamiento" de dos moléculas de diiodotirosina. Se sabía que este iodoaminoácido podía encontrarse en animales, puesto que hacía más de un siglo se había aislado de la gorgoninas. Su presencia en el tiroides había sido sospechada, pero no demostrada. Fueron Harington y Randall (1929) los que, cuatro años después de obtener la T_4 por síntesis, demostraron que efectivamente tam-

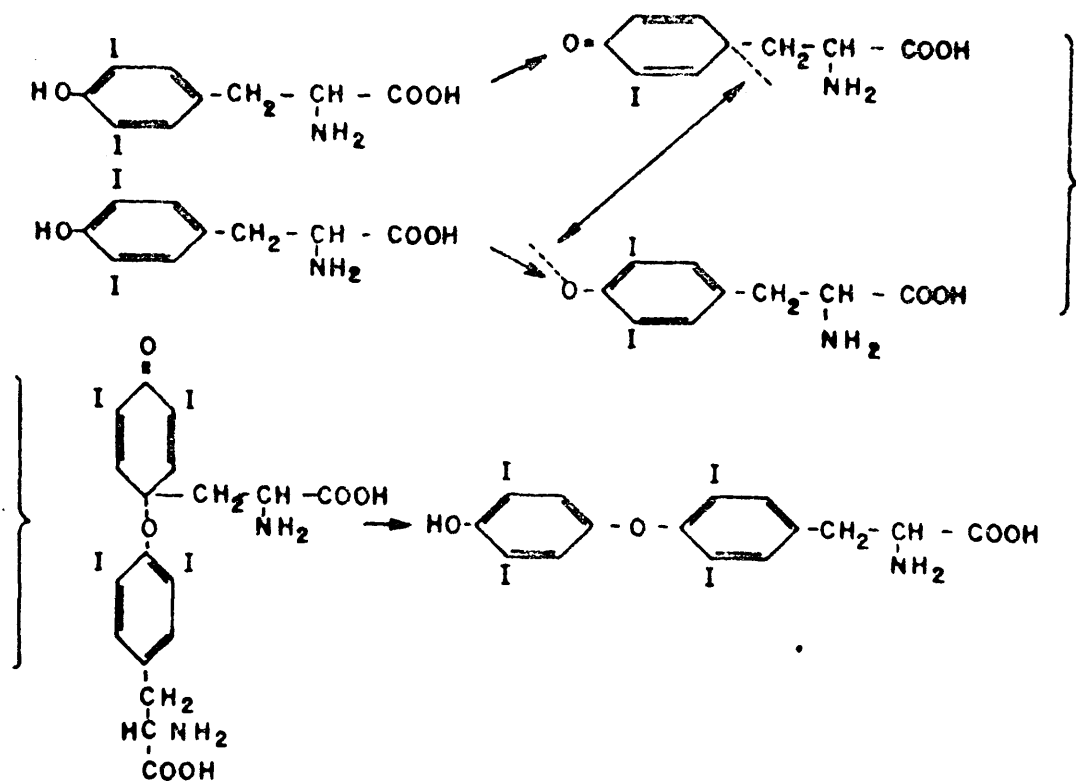


Figura nº 4, a.

Mecanismo hipotético de acoplamiento para la formación de T₄ a partir de 2 moléculas de DIT, propuesto por Harington en 1926. Por el momento no hay ningún argumento sólido en contra (y sí los hay en favor) de este mecanismo.

bién hay grandes cantidades de diiodotirosina en el tiroides. Esto infería plausibilidad a la idea de Harington, que fue recibiendo una aceptación creciente sobre todo considerando que la tirosina, necesaria como "precursor", es un aminoácido muy extendido en la naturaleza mientras que la "tironina" (véase Fig. 1, a) no se ha encontrado. Aunque se aceptó la idea de Harington de que la T_4 se forma por "acoplamiento" de dos moléculas de DIT, lo que al parecer se tendió a olvidar fue que también indicó que esta reacción de "acoplamiento" es de carácter oxidativo. Más interesante aun, es que Harington ya indicó que el potencial redox del iodo oxidado sería suficiente para esta reacción. En otras palabras, Harington indicaba con ello que es innecesario postular la existencia de un enzima específico para la fase de "acoplamiento" bastando para ello la presencia de un oxidante, que bien podría ser el iodo mismo. En 1939 Von Mutzenbacher presentó la primera prueba de que, por lo menos in vitro, la hipótesis de Harington sobre la formación de T_4 a partir de DIT, era cierta. Observó que si se dejaban al aire soluciones ligeramente alcalinas de DIT, se formaban cantidades pequeñas, pero claramente definidas, de T_4 . Parece ser que al principio ni Harington (1945) ni su alumna y colaboradora, Rosalind Pitt-Rivers, lo creyeron. Pero siendo como eran verdaderos científicos, se fueron al laboratorio para comprobar si era o no verdad. Encontraron que el hallazgo era fácilmente reproducible y demostraron además que se aumentaban notablemente los rendimientos en T_4 obtenidos a pH neutro si se añadía H_2O_2 o I en forma oxidada. Asimismo, se aumentaban los rendimientos en T_4 si se partía de DIT con los grupos amino y car-

boxilo de la cadena lateral protegidos (como lo estarían en un enlace peptídico). En años más recientes se ha seguido estudiando esta reacción y los posibles compuestos intermedios formados en la misma: todos ellos ponen claramente de manifiesto que pueden conseguirse notables rendimientos de T_4 en presencia de sistemas oxidantes y sin intervención de enzimas extraídos del tiroides, o de otro tejido animal.

Contemporáneamente a las primeras observaciones sobre la formación de T_4 a partir de DIT, Ludwig y Von Mutzenbacher (1939) iniciaron una serie de estudios, proseguidos luego principalmente por Pitt-Rivers y Harington (1948), y por la escuela de Roche y Michel, (1956) que demostraron muchas proteínas se pueden iodar muy fácilmente. Para ello basta disponer de iodo en forma oxidada. No sólo se obtenían MIT y DIT, sino que con algunas proteínas se obtenían rendimientos de T_4 de hasta el 20 %*. Con caseína, por ejemplo, se obtenía una iodoproteína de alta actividad biológica, a precio bajo, y con un contenido en tiroxina más estandarizable que el que se obtenía con polvo de tiroides. Por este motivo durante años se encontró una aplicación terapéutica a esta reacción, dedicándole mucha atención. Como resultado de esta serie de estudios, se demostró que la estructura de la proteína y el número de radicales de tirosilo ionizable tienen gran importancia para una buena producción de T_4 . Pero se vio

* Estos estudios se realizaron cuando aun no se había descubierto la presencia de T_3 en el tiroides, y cuando las técnicas analíticas tampoco permitían identificar esta hormona.

asimismo que otro factor esencial es la cantidad de iodo en forma oxidada. Si para una determinada cantidad de proteína se usaba poco iodo se obtenía una proporción mayor de MIT y muy poca DIT; a medida que aumentaba la cantidad de iodo empleada, lo hacía también la cantidad de DIT formada. A medida que aumentaba ésta, lo hacía la T_4 . A partir de una cierta cantidad de iodo, los átomos del mismo incorporados por unidad de proteína se hacían constantes, y asimismo se hacían constantes las proporciones de los distintos iodoaminoácidos.

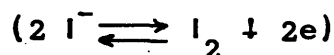
Por lo tanto, para la obtención de cantidades apreciables de T_4 in vitro en ausencia de tejidos animales, una proteína adecuada y una cantidad asimismo adecuada de iodo oxidado son suficientes. No es necesario la intervención de enzimas en los diversos pasos (incorporación del iodo a los radicales tirosilo, formación de DIT a partir de MIT, o de T_4 a partir de DIT). Sólo hace falta un sistema que oxide el I^- al nivel adecuado y cantidad adecuada de éste.

Por supuesto, estos estudios fueron aportando ideas sobre como podría ocurrir la formación de T_4 (y de T_3) en el folículo tiroideo. Tuvieron un gran impacto, pues se realizaron en una época en que se hacía muy difícil el estudio de procesos que ocurrían in vivo, sobre todo tratándose de compuestos presentes en cantidades tan pequeñas que prácticamente no eran detectables por los métodos existentes entonces. La situación cambió radicalmente con el advenimiento, hacia 1930-1935, de los isótopos radioactivos del iodo como poderosa ar-

ma de investigación de la fisiología tiroidea. Se empezó a determinar de forma directa si se podía aplicar al folículo tiroideo un esquema del tipo propuesto por Harington, y al que se acaba de hacer referencia, basado en los abundantes datos derivados de estudios in vitro.

En líneas generales puede decirse que los resultados que al fin pudieron obtenerse in vivo, gracias a los radioisótopos del iodo, iban indicando que un esquema de este tipo podría aplicarse a la síntesis de hormonas iodadas en el tiroides.

Por lo que respecta al paso resumido en la fase 2) (la oxidación del I^- a una forma más oxidante) se ha hecho notar que el potencial redox de la reacción



es de $\pm 0,535$ V, relativamente alto para la mayor parte de los sistemas redox biológicos. De entre los sistemas biológicos más usuales, sólo el H_2O_2 y el O_2 son oxidantes más fuertes que el I_2 a pH 7. Por eso, desde el primera momento se implicó una peroxidasa en este paso y esta idea recibió mayor consideración desde que Dempsey en 1944 presentara evidencia histoquímica de actividad peroxidásica en el tiroides. La búsqueda en el tiroides de un sistema capaz de oxidar el I^- ha llevado al aislamiento de una peroxidasa tiroidea por Taurog (1970). En presencia de un sistema generador de H_2O_2 , I^- y un sustrato adecuado, como la tirosina o, mejor aun, la tiroglobulina, esta preparación es capaz, no sólo de oxidar el

I^- , sino también de incorporarlo a los radicales tirosilo. Este resultado también puede conseguirse con peroxidasas de otro origen (mielo peroxidasas, peroxidasa de rábano) y pone en entredicho la idea de que para la incorporación del iodo a radicales tirosilo in vivo sea necesario un sistema específico del tiroides.

Para todos estos estudios, no sólo fueron de enorme ayuda los isótopos del iodo, sino también las drogas que impedían la síntesis de las hormonas tiroideas. Ahora bien, tanto los radioisótopos del iodo (I^*) como los antitiroideos resultaron ser poderosas armas de dos filos. La obtención de datos cinéticos usando I^* resultaba mucho más fácil que la valoración, por métodos químicos, de cantidades de iodoaminoácidos formados en distintas situaciones, naturales o experimentales. Como consecuencia de todo esto, se fue introduciendo la insidiosa y errónea costumbre de derivar conclusiones sobre cantidades a partir de datos porcentuales. Así, por ejemplo, si tras la inyección de I^* a un animal, se encontraba que la mayor proporción del I^* estaba en forma de MIT^* , se decía que "se había formado mucha MIT" cuando, en realidad la cantidad podría haber sido muy pequeña.

No es, pues, de extrañar que empezaron a aparecer discordancias y discrepancias. Se encontró que la distribución porcentual de iodoaminoácidos en hidrolizados de tiroides de animales de diferentes especies era diferente. Esto no tendría de suyo nada de particular pues la T.G. podía ser diferente para distintas especies. Pero es que también se encon-

traron distribuciones distintas para animales de una misma especie, y muy frecuentemente cada investigador encontraba datos distintos a los de otros, o de una vez para otra. Además, los datos variaban mucho al someter los animales a diferentes situaciones experimentales, en modo especial si estas incluían la hipofisectomía o el uso de antitiroideos del tipo de la tiourea, tiouracilos, etc. A veces se observaba que disminuía la proporción de I^* en forma de T_4^* y T_3^* aumentando las proporciones que se encontraban como MIT^* y DIT^* . En otros experimentos, sólo se observaba incorporación de I^* en forma de MIT^* , implicándose con frecuencia que ocurría lo mismo con los iodoaminoácidos no marcados. Por este motivo se empezó a hablar de "bloqueos de la síntesis", a nivel de paso $MIT \longrightarrow DIT$, o del paso $DIT \longrightarrow T_4$. Para explicar estos "bloqueos", se implicaron distintos sistemas o enzimas específicos para cada uno de estos pasos, o sea, un enzima "iodante" y otro "acoplante", respectivamente.

La hipotética existencia de unos sistemas o enzimas distintos del que efectúa la oxidación de I^- , recibió mayor aceptación general porque parecía, hacia 1960, que su falta podría asociarse a algunos casos de hipotiroidismo. En algunos casos de hipotiroidismo los datos obtenidos con I^* parecían indicar un "bloqueo" más o menos completo del paso $MIT^* \longrightarrow DIT^*$, o del "acoplamiento" de estas a T_4^* y T_3^* . No debe olvidarse que el final de la década del 1950 y el principio de los años sesenta coincide con un momento de euforia en el intento de explicar muchos procesos patológicos a base de defectos o ausencias de determinadas enzimas.

Pero, como veremos más adelante en la discusión de los datos de la presente tesis, la existencia de estas enzimas ("iodinasa" y "enzimas acoplantes") nunca tuvo una base muy firme y debe revisarse totalmente a la luz de conocimientos actuales, que al fin permiten explicar satisfactoriamente las aparentes discrepancias que dieron lugar a que se postulase su existencia.

Puede decirse, pues, que la formación de T_4 y T_3 no es un proceso que caracteriza ineludiblemente al folículo tiroideo: no sólo puede obtenerse estas hormonas in vitro y con facilidad, bastando para ello una proteína adecuada y iodo oxidado en cantidad suficiente, sino que se encuentra en los *Amphioxus*, que no tienen folículos tiroideos. Tampoco está excluido que puedan formarse en tejidos extratiroideos incluso en mamíferos (Taurog, 1964). Como además se ha indicado varias veces, tampoco está demostrado que alguno de los pasos que llevan a la síntesis intratiroidea de T_4 y T_3 necesite de un enzima característico y específico del tiroides.

Una vez formadas las iodotironinas (T_4 y T_3) permanecen unidas mediante enlaces peptídicos (fase 5) a la tiroglobulina y es en esta forma como se almacenan en el tiroides. A requerimiento del metabolismo periférico las hormonas deberán liberarse para alcanzar el torrente circulatorio, en un proceso que está regulado por el TSH, hormona que aumenta el englobamiento de las vesículas de coloide que, atrapadas por los microvilli penetran en el protoplasma en la célula tiroidea. Estas vesículas son hidrolizadas en los fagolisosomas que

contienen las proteasas específicas del tiroides (Wollman, 1965). Junto con los distintos aminoácidos presentes en la T.G. se liberan MIT y DIT y las iodotironinas u hormonas tiroideas; estas pasarán a la sangre mientras que las primeras serán desiodadas en la propia célula tiroidea por efecto de la deshalogenasa, recuperándose así un iodo que vuelve a ser utilizado.

La reacción de desiodación intratiroidea de MIT y DIT (fase 7) sí requiere la intervención de un enzima. Esta desiodasa o deshalogenasa de las iodotirosinas es, por ahora junto con la peroxidasa tiroidea de Taurog (1970), el mejor estudiado de los posibles enzimas que se postula juegan un papel en el metabolismo intratiroideo del iodo. Hasta que Roche (1956) y su escuela demostraron su presencia en el tiroides, y pusieron de manifiesto que sólo actúa sobre las iodotirosinas (y no sobre las unidas por enlaces peptídicos) y que apenas afecta a las iodotironinas, no se comprendía cómo era posible que estas últimas fuesen las únicas que pasaban a la sangre. A pesar de estar bien caracterizado como enzima de gran importancia para la economía del iodo en el organismo animal, este enzima tampoco es típico y exclusivo del folículo tiroideo: los estudios realizados por Stanbury y Cols. (1955, b) demostraron que en los individuos en cuyos tiroides falta esta actividad iodotirosina-desiodante, carecen también de ella en tejidos periféricos. Demostraron además que este defecto está determinado genéticamente.

Qué hay, entonces, en el complejo sistema por el cual el folículo tiroideo suministra al organismo las cantidades de hormonas iodadas requeridas por éste, que sea típico del folículo tiroideo? Hasta que no se demuestre lo contrario, lo que hay de más específico es precisamente la proteína más abundante del tiroides, la tiroglobulina y, posiblemente, el sistema por el cual ésta se hidroliza.

Por su creciente importancia y las posibles implicaciones clínicas de estos conocimientos, se debe hacer una referencia más explícita a numerosas pruebas que se están acumulando desde 1957, y que sólo se han interpretado correctamente a partir de 1968. Como iremos viendo, se han comprendido al fin las causas básicas de las numerosas discrepancias observadas en la distribución intratiroidea del I^* , a las cuales ya se ha hecho referencia. Como veremos, todas ellas pueden referirse a una común: la cantidad de I en forma oxidada.

A partir de 1957, se fueron describiendo observaciones sobre la distribución de I^* entre los iodoaminoácidos tiroideos, que empezaron a aclarar un poco la complicada maraña de datos entonces existentes. Lachiver y Leloup (1955), Querido y Cols. (1957), Bois y Larsson (1958, a, b), demostraron que en animales sometidos a una ingesta muy baja en iodo había un aumento de las proporciones relativas de los iodoaminoácidos "monoiodados". O sea, la proporción del I^* inyectado, que se encontraba como MIT^* , era superior a la que se encontraba como DIT^* , al contrario de lo que ocurría en animales normales. Lo mismo ocurría con la T_3^* ("mono-

iodada") frente a la T_4^* . Además, la suma de los % de I^* en forma de $T_4^* + T_3^*$ estaba más baja que en animales normales. Aunque Bois y Larsson (1958, a, b) sugirieron que estos cambios podían estar relacionados con la cantidad de iodo que contenía el tiroides, se pensó que era más probable que los cambios se debían más directamente a la intensa estimulación por TSH de las glándulas de animales crónicamente a déficit de iodo. Posteriormente, otros autores demostraron que la administración de iodo revertía estos efectos. Las condiciones usadas por ellos, sin embargo, no permitían distinguir si esto se debía o no a la normalización de los niveles circulantes de la TSH. Hace muchos años, durante un estudio sobre los efectos de la administración de iodo en la secreción de I^* por el tiroides (Mouriz y Cols., 1966) observaron repetidamente unos hechos que entonces no se podían explicar: si parte del ^{127}I inyectado entraba en la glándula "premarcada" aumentaba la proporción de I^* que se encontraba en la glándula como T_4 , aunque el I^* se hubiese administrado varios días antes que el ^{127}I . Observaron también que esto sólo ocurría si antes de inyectar el contenido en iodo del tiroides era muy bajo. Como no se supo explicar esta observación, se limitaron a describirla. Pero a partir de este trabajo, se empezó a determinar de forma rutinaria el ^{127}I tiroideo de todos los animales sometidos a diversos experimentos, cualquiera que fuesen éstos. Al cabo de los años se dieron cuenta que, si se recogían todos los datos obtenidos en animales a distintas ingestas de iodo y a distintos tiempos de la inyección de I^* , tratados con muy diferentes drogas, de distintas edad y sexo, etc., había una relación inversa entre los cocientes

$\text{MIT}^* / \text{DIT}^*$ y $\text{T}_3^* / \text{T}_4^*$ y la cantidad de iodo estable encontrada en la glándula (Herrera y Cols. 1965, 1968). De forma que en glándulas muy pobres en iodo había los altos cocientes $\text{MIT}^* / \text{DIT}^*$ y $\text{T}_3^* / \text{T}_4^*$ descritos por otros como típicos de los animales a dieta deficiente en iodo. La finalidad de esos experimentos no había sido la de ver estas relaciones. A pesar de ello, cuando se representaron los datos que allí se habían obtenido, se observó claramente la existencia de dicha relación entre la distribución y el contenido de I en el tiroides. Se puso además de manifiesto algo que pareció del máximo interés: aunque los cambios más intensos de los cocientes $\text{MIT}^* / \text{DIT}^*$ y $\text{T}_3^* / \text{T}_4^*$ tenían lugar en animales con bocio y niveles elevados de TSH en plasma, también había cambios graduales en los tiroides de animales cuya producción de hormonas tiroideas era suficiente como para evitar un aumento del nivel de TSH en plasma. Esto venía a indicar que, posiblemente, las proporciones relativas de los iodoaminoácidos tiroideos no estaban tan directamente relacionadas con los niveles de TSH en plasma, como se había estado creyendo, sino que dependían más directamente de las cantidades de iodo disponibles en la glándula. Para aportar más datos respecto a esta posibilidad el Dr. Luis Lamas emprendió en nuestro laboratorio un estudio encaminado a investigar:

- a) si hay cambios en la distribución porcentual de iodoaminoácidos marcados y estables en tiroides normales, pero con diferentes contenidos en iodo y b) qué cambios hay en las cantidades de cada uno de ellos. Se encontró (Lamas y Morreale de Escobar, 1972) que por encima de una ingesta de unos

9 $\mu\text{g I}^-$ añadidos / 10 g de LID, la cantidad de iodo que se encuentra en el tiroides de los animales es relativamente constante. Por debajo de esta ingesta se pueden obtener glándulas con un contenido decreciente de iodo, pero que al mismo tiempo no muestran signos de hipertrofia de la glándula y son capaces de asegurar un PBI plasmático que es normal para la rata. Es de presumir que los niveles de TSH eran normales en todos estos animales, a pesar del diferente contenido en iodo de sus tiroides. Por análisis químico directo se encontró que a medida que aumenta el contenido en iodo del tiroides, aumenta el contenido de cada uno de los compuestos iodados en él existentes. Pero si se consideran los datos en forma porcentual, se observó nuevamente que los cocientes MIT / DIT ó T_3 / T_4 , (tanto I^* como estables) disminuyen a medida que aumenta la ingesta y/o el contenido de iodo en las glándulas, incluso en aquellas normales. En estas condiciones los cambios son más graduales que en el caso de glándulas de animales deficientes en iodo e hipertróficas, pero son claramente demostrables. Al mismo tiempo que en nuestro laboratorio se estaba demostrando que los cocientes MIT / DIT y T_3 / T_4 son una función del contenido en iodo del tiroides incluso en glándulas normales, fueron apareciendo resultados, obtenidos por Inoue y Taurog (1968, a, b), que venían a confirmar esta conclusión. Estos autores no habían medido el contenido en iodo de las glándulas estudiadas, pero sí la ingesta de iodo de los animales. Esto hizo posible comparar los datos de ambos laboratorios, encontrándose una coincidencia muy llamativa que sirve de apoyo a la conclusión de que la distribución relativa de iodoaminoácidos que se obser-

va en un animal está determinada por algún factor estrechamente relacionado con el iodo de que dispone la glándula. En condiciones normales, éste bien podría ser la cantidad de iodo en forma oxidada. Inoue y Taurog vieron además que las bajas proporciones de T_4^* de glándulas muy pobres en iodo aumentaban bruscamente a niveles normales tras el aporte súbito de una cantidad, incluso pequeña, de ^{127}I . En otras palabras, y usando un lenguaje que ya se ha hecho habitual, un pequeño aporte de iodo a una glándula deficiente en este elemento puede aumentar bruscamente la eficiencia del "acoplamiento". Si éste ya era normal, un ulterior aporte de iodo no tiene influencia. Las condiciones experimentales usadas por estos autores eran muy parecidas a aquellas obtenidas en nuestro laboratorio a las que ya se ha hecho referencia, y que no se había sabido interpretar (Mouriz y Cols., 1966). Dichas condiciones hacían muy improbable que el aumento en la eficiencia del "acoplamiento" se debiese a la súbita restitución de la función de un hipotético "enzima acoplante". Más adelante se hará referencia a otros datos de Inoue y Taurog, sobre la "maduración" de la tiroglobulina que acompaña este fenómeno y que han permitido comprender mejor esta observación. Estudios realizados por Ermans y Cols. (1968, a, b), en tiroides humanos, les llevaron independientemente a unas conclusiones parecidas a las de Inoue y Taurog (1968, a, b) y las de nuestro laboratorio: que la distribución de iodoaminoácidos era función del grado de iodación de la tiroglobulina, no siendo necesaria la hipertrofia glándular para observar un aumento en los cocientes MIT / DIT y T_3 / T_4 , sino una disminución de la iodación de la tiroglobulina. Estos autores

al igual que Inoue y Taurog, llegaron a la conclusión de que lo único que haría una estimulación por TSH es hacer aparecer más intensos estos cambios, porque al aumentar la secreción de compuestos iodados y al hipertrofiarse la glándula, se haría cada vez más insuficiente el iodo de que dispondría cada célula folicular para la iodación de una misma cantidad de proteína. Vemos pues, que durante los últimos años se está acumulando creciente evidencia que in vivo, al igual que in vitro, lo que se necesita para síntesis eficiente de T_4 y T_3 son a) iodo incorporable (oxidante) en cantidades suficientes y b) una proteína, cuya estructura sea adecuada. La única fase del proceso in vivo en la que al parecer hacen falta enzimas es en la de oxidación del I^- o la liberación del mismo en forma oxidada a partir de MIT y DIT, y en la hidrólisis de la T.G. O sea, hacen falta una peroxidasa, una proteasa capaz de digerir la tiroglobulina y una deshalogenasa capaz de desiodar la MIT y DIT libres.

Es precisamente la consideración de la necesidad b), (una proteína de estructura adecuada) lo que al fin nos ha hecho comprender qué es lo realmente característico del folículo tiroideo. No sólo, sino que se ha demostrado que la síntesis eficiente de T_4 , o sea, la reacción de "acoplamiento" va íntimamente ligada a la "maduración" de esta proteína, y esta maduración (que se definirá más adelante) a su vez, depende de la cantidad de iodo disponible. Por eso, vamos a dedicar especial atención a lo que se conoce de la tiroglobulina.

La tiroglobulina, o alguna subunidad de la misma, se encuentra en todos los vertebrados, empezando por la forma adulta de la lamprea, y, que se sepa, sólo se encuentra en los folículos tiroideos o en las estructuras "precurso-ras"^{*}. Es, a nuestro modo de entender, lo que realmente caracteriza al folículo tiroideo. Es interesante que Oswald descubriera y caracterizara esta proteína bastante antes de que se aislara la T_4 . Pero la mayor parte de los esfuerzos iniciales iban dirigidos a destruirla para dejar en libertad la máxima cantidad del "principio activo" del tiroides. Desde un principio estaba claro que en el tiroides las hormonas iodadas están incorporadas en esta proteína, pero que ya no lo están las hormonas circulantes. La tiroglobulina queda retenida en el folículo tiroideo. Es tan característica de éste, que resulta una proteína "extraña" para el resto del organismo: su presencia fuera del folículo resulta antigénica en la misma especie animal de la que se ha obtenido. Por lo tanto, al demostrarse que la tiroglobulina no es la forma circulante ni la forma activa de las hormonas del tiroides y dándose además la circunstancia de que la química de macromoléculas siguió estando en su infancia durante varias décadas más, hubo un interés muy moderado por esta proteína. Esto contrastaba con

^{*} Indudablemente, desde un punto de vista teórico no se puede excluir que en Procordados y en Ammonoceotes premetamórficos se formen iodoproteínas de la familia de la tiroglobulina de los vertebrados superiores: la falta de organización en folículos del tejido parafaríngeo que podía ser capaz de sintetizarlas haría muy improbable encontrarlas, puesto que los enzimas proteolíticos del tracto intestinal, al que serían vertidas, inmediatamente impedirían su identificación.

lo intensamente que se estaba investigando el metabolismo intratiroideo del iodo, cuyo estudio era más asequible gracias al I^* . Pero Derrien y Cols. (1948) realizaron unos estudios pioneros sobre la tiroglobulina. Dedujeron que los iodoaminoácidos no se incorporaban a la misma una vez iodados, sino que se formaban por iodación de radicales tirosilo ya incorporados en la tiroglobulina. Esto contribuyó a despertar el interés por esta proteína. Es posible que el apasionado interés actual por la iodoproteínas tiroideas se deba en gran parte a la reciente y clara demostración de lo que ya intuyó Derrien: que son la matriz sobre las que se sintetizan las hormonas del tiroides, y pueden, por tanto, considerarse como una "pro-hormona". Efectivamente, se ha demostrado que cualquier transfer-RNA purificado a partir del tiroides es incapaz de ligar los iodoaminoácidos. También se ha visto que hay incorporación de I^* a tiroglobulina aunque se bloquee la síntesis de nuevas proteínas mediante la adición a cortes de tiroides de inhibidores como la puromicina (Taurog, 1964). Sea por éste o por otros motivos, sea por el perfeccionamiento en las técnicas de estudio de las proteínas, puede decirse que es en la década pasada cuando empieza a "moverse" de forma casi vertiginosa el interés por estas proteínas tan típicas del folículo tiroideo. Al fin y al cabo, como ahora veremos, parece que son lo más específico que aporta el tiroides al proceso de la síntesis de las hormonas iodadas.

Pero no ha sido únicamente el estudio de los iodoaminoácidos tiroideos lo que ha ido demostrando que la cantidad de iodo "incorporable" de que dispone la célula folicular

juega un papel muy crucial en la eficiencia de la formación de T_4 . Como veremos, a partir de los estudios sobre las proteínas tiroideas de la familia de la tiroglobulina se ha ido llegando a parecida conclusión.

Con respecto a la importancia de la tiroglobulina para la síntesis de T_4 y T_3 han sido fundamentales los estudios iniciados por Robbins y Rall (1960), desarrollados por Edelhoch (1965, 1966, 1968) y colaboradores, por Salvatore (1969) y su escuela, por los grupos belgas (Ermans, 1968, a, b; De Nayer, 1967; Crombrugghe, 1966, 1967) y por numerosos otros investigadores. La mayor parte de las proteínas solubles del tiroides normal de los vertebrados está constituida por la tiroglobulina (T.G.) nativa o por las proteínas que Salvatore denomina "tiroglobulino-similes" o de la "familia de las tiroglobulinas". La T.G.-nativa es una iodo-proteína de peso molecular muy elevado, que contiene carbohidratos (Spiro, 1965) y características físicas, bien definidas. De entre estas, se emplea mucho el coeficiente de sedimentación en la ultracentrífuga, que es de aproximadamente 19 S para la T.G.-nativa de la mayoría de los vertebrados. Precisamente se define ^{también} como tiroglobulina (T.G.) a la que tiene ~~un~~ coeficiente de sedimentación 27 S, y ~~un~~ un peso molecular doble al de la tiroglobulina nativa y contiene más iodo y más T_4 que ésta (Salvatore, 1969). En las preparaciones obtenidas a partir del tiroides de algunas especies, como el cobaya, que tienen un metabolismo del iodo muy lento, se encuentra una proporción más o menos alta de otra proteína de coeficiente de sedimentación inferior (12 S) y de peso

molecular aproximadamente la mitad del de la T.G. No es seguro que esta iodoproteína 12 S exista como tal al estado nativo en el cobaya, pues es muy probable que se forme por disociación de la T.G.-19 S en dos subunidades, durante el proceso de aislamiento (Schneider y Edelhoch, 1970). Pero en la lamprea adulta sí que solamente se encuentra una proteína 12 S en aquella estructura (el endostilo), que podría considerarse como el "precursor" del folículo tiroideo típico de los demás vertebrados. Es de mucho interés la observación de que cuánto menor es el coeficiente de sedimentación, menos iodada está la proteína. Asimismo, cuanto menos iodada está la proteína 19 S (T.G.), más fácilmente se disocia en subunidades 12 S por cambios de pH y de temperatura, (Sneider y Edelhoch, 1969; Schneider y Edelhoch, 1970; Rosenberg y Cols. 1969; Cabalieri y Cols., 1970). Aun no se sabe si la proteína 12 S es a su vez un dímero de una subunidad 6 S o un tetrámero de otra aun más pequeña. Sean cuales fueren estas relaciones entre las subunidades, parece que puede aceptarse con cierta seguridad que las cadenas polipeptídicas elementales se van polimerizando en unidades de coeficiente de sedimentación cada vez mayor, hasta formarse la proteína 12 S. Es a partir de este momento cuando se completa la incorporación de las cadenas glucopépticas y la unión de dos subunidades 12 S, necesaria para la formación de T.G.

Entre los hallazgos más significativos de la presente tesis está el haber encontrado que lo que se forma por cadenas 12 S es una tiroglobulina de coeficiente de sedimentación

de aproximadamente 17 S, y no de 19 S. Esta última, la T.G. "madura", sólo puede formarse cuando hay un aporte suficiente de iodo "incorporable" (o sea, en forma oxidada). Si éste falta, la 17 S no "madura" a 19 S. Esto ocurre en animales experimentales en los que se hace insuficiente el iodo "incorporable". Esto puede resultar tanto de una dieta muy pobre en iodo, como por el uso de antitiroideos (tiouracilos, metimazoles, etc.) que impiden que el I^- pase a iodo "oxidante". Se ha demostrado por Mouriz, Riesco y Usobiaga (1969), en humanos en los que falta el sistema oxidante del yoduro. La formación de T.G. 17 S requiere la polimerización de dos subunidades 12 S y la incorporación de la parte glucídica. Pero el paso 17 S a 19 S ya no requiere polimerización, sino que se trata de un proceso mediante el cual se estabiliza la unión de las subunidades 12 S. Se considera como un proceso de "maduración". A medida que aumenta el coeficiente de sedimentación de esta proteína, ocurren los siguientes procesos: i) se hace más difícil su disociación en subunidades 12 S; ii) aumenta notablemente el contenido en iodo y iii) hay un brusco aumento del contenido en hormona, T_4 y T_3 , hasta formarse cantidades fisiológicamente significativas.

Con el estudio de la maduración de la tiroglobulina (paso de 17 S a 19 S), han "madurado" asimismo nuestros conceptos sobre la síntesis de las hormonas iodadas, al demostrarse que los procesos i), ii) y iii), que acabamos de resumir, están íntimamente ligados entre sí. No sólo, sino que

el factor común del que dependen los tres procesos es la cantidad de iodo asequible en forma oxidada (y oxidante).

Por lo que respecta a i) parece ser que los enlaces mediante los cuales la 12 S forma 17-19 S no son fuertes, puesto que se pueden romper aumentando el pH hasta 9,5 (Edelhoch, 1960), obteniéndose con este pH la forma 12 S nuevamente, siendo la reacción reversible. Sin embargo, por lo que se refiere al paso 17 S-19 S parece ser que el iodo, al incorporarse a la 17 S para formar la 19 S, oxidó grupos -SH formando puentes S-S intramoleculares que confieren estabilidad en la formación de la molécula; como consecuencia se haría más difícil su disociación a la forma 12.S. El aumento del contenido en iodo, indicado en ii) va *pari passu* con el proceso de maduración: cuanto más iodo se ha incorporado en la T.G., mayor es la proporción de 19 S con respecto a las iodoproteínas de coeficiente de sedimentación más bajo (12 S y 17 S). La demostración de que estos dos fenómenos van unidos ha sido indudablemente otro importante jalón. Lo es aun más la reciente demostración, por Inoue y Taurog (1968, b) y Camus (1971), de que al formarse la iodoproteína 19 S madura, aumenta simultáneamente la cantidad de T_4 que contiene, hasta que se alcanzan cantidades fisiológicamente significativas de hormona como hemos indicado en iii). Para que esto ocurra sólo hace falta que aumenten las cantidades disponibles de iodo incorporable (y oxidante).

O sea que, dada la proteína 17 S, la maduración

a 19 S y la síntesis de cantidades adecuadas de hormona sólo requieren cantidades adecuadas de iodo en forma incorporable, o sea, de iodo oxidado. Por tanto, cualquier proceso que interfiera con ésto último, interfiere a la vez con la maduración de la T.G.: una falta intensa y prolongada de iodo en la dieta, la administración de drogas que impiden la entrada de iodo, y, más aun, de las que impiden su oxidación (tioureas, tiouracilos, metimazoles, etc.), la falta de un sistema ioduro-oxidante (peroxidasa tiroidea), una relativa falta de iodo debido a una ausencia del enzima deshalogenante de las iodotirosinas, etc., tienen al final una misma expresión bioquímica: una deficiente maduración de la T.G. y una síntesis deficiente de T_4 . Cuanto más intensa la falta de iodo oxidante e incorporable, antes se interrumpirá el proceso de maduración de la T.G. y mayor será la proporción que nos encontraremos de iodoproteínas con un coeficiente de sedimentación $< 19 S$.

Hay ciertas observaciones, nuestras y de otros que se detallan en la presente tesis, que indican que la cantidad de iodo oxidante también juega un papel importante en la ulterior polimerización de la T.G. 19 S a su dímero 27 S, aunque por ahora ésto esté menos comprobado que para el paso $17 S \rightarrow 19 S$.

Porqué la cantidad de iodo oxidante es un factor tan crítico en el aumento de la eficiencia de "acoplamiento", que acompaña a la maduración de T.G. (paso $17 S \rightarrow 19 S$)? No se sabe. Podría ser que, al oxidar el iodo los grupos SH y formarse los puentes S-S intramoleculares, haya cambios

estéricos por los cuales se hacen ionizables y "iodables" radicales tirocilo que antes estaban inasequibles, lo que daría lugar a un aumento de radicales DIT, acoplables. Pudiera ser que, además al formarse esos puentes S-S, se pusieran en posición adecuada para el acoplamiento unos radicales DIT que antes no lo estaban. Puede ser que, además, el aumento del poder oxidante debido al aumento de iodo en forma oxidada facilite el acoplamiento de los radicales DIT, ya que sabemos que ésta es una reacción oxidativa.

Sea cual fuere el mecanismo por el cual la cantidad de iodo influye de forma tan crítica en la maduración de la T.G. y en la simultánea formación de cantidades significativas de T_4 , lo que es indudable es que este proceso de integración de conocimientos derivados de distintos campos de investigación ha sido ya, y promete seguir siendo, muy fructífero. A continuación podemos ver algunos ejemplos.

Se ha llegado a adjudicar cada una de las distintas "alteraciones" de la distribución intratiroidea del I^* con un punto determinado del proceso de maduración de la T.G. Cuando hay muy poco iodo incorporado en la 17 S, se forma casi exclusivamente MIT. Si para el estudio se usa I^* , se obtendrá casi exclusivamente MIT^* . Debido a nuestra mala costumbre de expresar los datos obtenidos con I^* de forma porcentual, el cuadro aparente será, que hay un aumento de la MIT, y un bloqueo del paso $MIT \rightarrow DIT$. O sea, el mismo que dio lugar a la sugerencia de que hacía falta una "iodasa" para la ulterior iodación de MIT a DIT. Pero en realidad, es-

te cuadro no se debe a una deficiencia en este hipotético enzima, sino a una intensa deficiencia en la cantidad de iodo incorporado a la proteína. Una vez iodados todos los residuos de tirosina que son iodables, si la cantidad de iodo aumenta un poquito empieza a formarse también DIT y algo (muy poco) de T_4 y T_3 . Aparecerá entonces una distribución de I^* en la que los cocientes MIT^* / DIT^* y T_3^* / T_4^* son muy altos y muy bajo el % de I^* que se encuentra como $T_4^* + T_3^*$. Esto se parecerá mucho al cuadro descrito para la presunta deficiencia en un hipotético enzima o sistema "acoplante". Nuevamente nos encontramos con que lo que en realidad hay es una deficiencia en la cantidad de iodo, aunque menos grave que cuando sólo se encuentre MIT^* . Al aumentar la cantidad de iodo de tal forma que pueda madurar al fin la T.G., hay un aumento brusco de la cantidad de T_4^* (y T_3^*), lo cual se acompaña de una disminución de los cocientes MIT^* / DIT^* y T_3^* / T_4^* . Esto explicaría por qué, cuando mayor es la cantidad de iodo reactivo e incorporable de que dispone un tiroides menores son los cocientes MIT / DIT y T_3 / T_4 hasta que se llega a los valores típicos de glándulas que contienen el máximo de iodo orgánico (a 0.40 y 0.18 para los cocientes MIT / DIT y T_3 / T_4 , respectivamente, en tiroides de rata).

Considerando lo que se ha resumido hasta aquí, parece muy importante que se intenten incorporar los nuevos conceptos en los esquemas que se presenten para dar una idea del proceso biosintético que lleva a la formación de cantidades fisiológicamente adecuadas de hormonas tiroideas iodadas. Di-

chos esquemas no deben contentarse con alguna referencia más o menos nebulosa de que esta síntesis "ocurre en una proteína, la tiroglobulina", sino que deben poner énfasis en lo importante que es esta matriz. En la presente tesis se demuestra cómo la presencia en el tiroides de T.G. es absolutamente indispensable para la formación de T_4 y T_3 en cantidades adecuadas. Tan importante es, efectivamente, la T.G., que bastan ésta y una cantidad adecuada de iodo oxidado para que el proceso biosintético llegue a completarse. En modo especial se debe evitar dar la impresión de que hay algo muy específico del tiroides en el proceso de incorporación del iodo para formar MIT, en el que tiene lugar cuando se forma DIT, o de que haya necesidad de postular un sistema enzimático específico para el "acoplamiento". En realidad, como ya indicó Harington hace tantos años, bastaría un sistema capaz de transformar el yoduro procedente de la sangre, en iodo oxidado. Por lo tanto no hay en el momento actual evidencia real en favor (y sí la hay en contra, como veremos en la discusión de la presente tesis) de la idea de que puede haber hipotiroidismo por falta de "iodasa", "acoplasa", etc., y es de esperar que toda referencia a ello vaya desapareciendo de los libros de texto de Endocrinología Clínica. Sí hay evidencia de que los pueda haber por deficiencia de una peroxidasa o iodotirosina-desiodasa, pero no en el caso de los demás enzimas que siempre fueron meramente hipotéticos. Las anomalías que puedan encontrarse en la distribución intratiroidea del I^* reflejarían el mayor o menor grado de déficit en iodo oxidado e incorporable, o la ausencia de T.G.

Aunque sea prematuro, no se puede dejar de señalar que en la estructura de la tiroglobulina hay algo, aun no identificado, que hace especialmente idónea para cumplir con una de las funciones que se han asignado al folículo tiroideo al comienzo de esta introducción: la de aprovechar eficientemente las pequeñas cantidades de iodo de que suelen disponer los vertebrados superiores. Al fin y al cabo, si por iodación de la albúmina del suero, por ejemplo, se llega a obtener T_4 y T_3 , para qué perfeccionar una máquina especial para sintetizar T.G.? Por trabajos que está realizando G. Salvatore, iniciados en Edelhoch, y en los que está trabajando ahora el Dr. L. Lamas con Taurog en Dallas, parecería que la iodación de la T.G. permite la síntesis de cantidades importantes de T_4 y T_3 en presencia de cantidades de iodo mucho más bajas que las que se requieren para obtener la misma cantidad de hormonas usando como substratos otras proteínas que no sean la T.G., sobre todo si se hace iodación catalizada por peroxidasa tiroidea aislada por este último autor. Como veremos en la presente tesis, cuando hay una falta congénita de T.G. se iodan efectivamente otras proteínas, pero las cantidades de T_4 y T_3 que se llegan a formar, son insuficientes para prevenir el bocio y el hipotiroidismo.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS DE LA PRESEN-
TE TESIS

En toda la exposición que antecede, se han tratado de exponer los conceptos sobre síntesis de las hormonas iodadas del tiroides a los que he ido llegando. Naturalmente la realización del trabajo recogido en la presente tesis así como el estudio de los resultados publicados por otros investigadores, durante el tiempo en que ésta se ha ido realizando, han contribuido no poco, a la maduración de los conceptos aquí expuestos.

Por lo tanto, resulta casi imposible redefinir cuales eran mis conceptos antes de iniciar la presente tesis y en que momentos de su realización, he ido adquiriendo los conocimientos que me han llevado a la formulación de las ideas ya expuestas.

Sin embargo, para comprender el planteamiento de la presente tesis, y el porqué se han realizado sistemáticamente estudios simultáneos de iodoaminoácidos tiroideos y de proteínas solubles y el porqué de haber completado la experiencia obtenida de glándulas humanas con la adquirida de la experimentación animal, convendría volver hacia atrás en el tiempo, colocándonos en el estado de nuestro conocimientos en 1968.

Cuando se empezaron los estudios recogidos en la presente tesis, aun no habían aparecido los trabajos fundamentales de Inoue y Taurog (1968, a, b), en ratas, que tan claramente demostraron el importante papel que juega la cantidad

de iodo asequible al tiroides, tanto para la composición de iodoaminoácidos tiroideos, como para la "maduración" de la tiroglobulina. Aunque conocía bastante de cerca los resultados de Lamas y Morreale de Escobar (1972), por estar realizándose en el mismo Departamento, tampoco se había llegado a una elaboración total de los datos, que vinieron a demostrar claramente que, incluso en tiroides normales de rata, la cantidad de iodo es el factor principal en la determinación de la distribución porcentual del iodo entre iodoaminoácidos.

Como consecuencia de esta falta de información fundamental, resultaba que aun no se había encontrado el factor común, el hilo unificador, que permitiese encontrar orden y sentido en tantas y tantas observaciones realizadas en animales experimentales, sometidos a diferentes situaciones. Por este mismo motivo, no se había comprendido que los trabajos antiguos de Lachiver y Leloup (1955), Querido y Cols. (1957), Bois y Larson (1958, a, b), entre otros a los que ya se ha hecho referencia, nos estaban dando una pista fundamental sobre la importancia que tiene la cantidad de iodo asequible al folículo tiroideo, como determinante de la proporción del iodo incorporado a T_4 y T_3 . Estas observaciones yacían entonces casi en el olvido, sepultadas entre tantas y tantas otras, en las que se describían "alteraciones" de las proporciones relativas del I^* incorporado a MIT^* , DIT^* , T_4^* y T_3^* , como consecuencia de las más variadas manipulaciones experimentales. Se concluía de tales trabajos que una determinada situación, o droga, inducía un "bloqueo" específico de una u otra fase del proceso de biosíntesis. Incluso, como ya se ha hecho notar aquí, en el

capítulo que antecede, se llegó a tener que invocar la existencia de unos hipotéticos enzimas, cuya falta o inactivación, podían luego permitir explicar las alteraciones biosintéticas observadas. Se estaban utilizando expresiones como la de "defectos biosintéticos" que realmente indujeron a error durante muchos años, pues tales expresiones parecen llevar implícito, el concepto de que hay alguna anomalía en alguna fase concreta del proceso de biosíntesis. Ahora, a la luz de conocimientos ulteriores, sabemos que en la mayoría de los casos, lo que estaba ocurriendo es que, por falta de iodo oxidado, el proceso se detenía en una fase anterior a la que llegaría en condiciones normales. Tan anterior, cuanto más grave la deficiencia en iodo.

Anteriormente a los trabajos ya citados, de modo especial a los de Inoue y Taurog (1968, a, b), la confusión era aun mayor si se intentaban comprender los diferentes patrones de cantidades relativas de iodoproteínas solubles con distintos coeficientes de sedimentación, observadas en diferentes situaciones experimentales.

Si eran confusos nuestros conceptos con respecto a la biosíntesis de hormonas iodadas del tiroides de animales experimentales, más aun lo eran a la hora de considerar glándulas humanas normales. No digamos ya las patológicas. Hasta 1968 no aparecieron los trabajos de Ermans y Cols. (1968, a, b) que luego han resultado ser fundamentales para encontrar el nexo de unión entre numerosas y discrepantes observaciones realizadas en humanos.

Deseo señalar que los trabajos que más claramente están demostrando, al igual que la presente tesis, que en la mayoría de las alteraciones que afectan al tiroides humano, es el grado de iodación de la tiroglobulina, lo que determina la distribución porcentual del iodo y la eficiencia de la síntesis de T_4 y T_3 , se han ido realizando contemporáneamente a la presente tesis y hace muy poco que se han presentado como comunicaciones a congresos, no estando aun publicados in extenso (Camus, 1971; Rolland y Cols., 1971). Cuando se comenzó el trabajo presente había muy poca información procedente de glándulas normales y patológicas que permitiese relacionar las proporciones relativas de iodoaminoácidos y las proporciones relativas de proteínas solubles, con el proceso patológico que afectaba a la glándula.

Este fue el propósito inicial de la presente tesis; ver si en tiroides humanos, afectados por diferentes procesos patológicos, se encontraban distribuciones relativas de iodoaminoácidos y/o de proteínas solubles, que fuesen característicos de dicho proceso y que pudiesen estar implicados de alguna forma con el proceso etiológico.

Asimismo, cuando se comenzó el presente estudio había una tendencia bastante generalizada a suponer que, en muchos casos de afecciones tiroideas, podía haber un "defecto" biosintético básico que, era debido a la falta congénita de alguno de los varios hipotéticos enzimas a los que se adscribió un papel en la biosíntesis de las hormonas tiroideas. Incluso se pensaba en la posibilidad de que en determinados casos

se sintetizara una tiroglobulina anómala que dificultara el proceso normal de biosíntesis. En 1968 había pruebas concluyentes de que podían darse alteraciones de estos tipos: se había demostrado por pruebas muy directas de que podían darse bocios congénitos por defecto genético de deshalogenasa de las iodotirosinas (McGirr y Cols., 1953; Hutchison y Cols., 1954). Había asimismo numerosos casos (Stanbury y Cols., 1950; Haddad y Cols., 1959; Gardner y Cols., 1959) de bocio con hipotiroidismo en los que se observaba que el I^* captado se descargaba en gran proporción como tal, con $SCNK$ o ClO_4K pues no llegaba a incorporarse a compuestos orgánicos. En algunos de estos casos se comprobó que todo el I^* captado permanecía en éste en forma de I^{-*} y se supuso, al parecer ciertamente, que había una ausencia de peroxidasa tiroidea, otro enzima cuya existencia ha sido confirmada claramente después (Taurog, 1970). Pero no había pruebas convincentes de falta de otros enzimas como la "iodinasa" o el "enzima acoplante" ni pudo demostrarse que hubiese tiroglobulina anómalas en casos de tiroides humanos. Cuando se empezó el presente trabajo, Lissitzky y Cols. (1964, 1967, 1968) habían realizado un estudio muy completo de unos enfermos con bocio congénito, en cuyos tiroides había gran proporción de albúmina y prealbúmina iodada. Pero la tiroglobulina que había era, al parecer, normal.

No pareció, pues, que era del máximo interés el estudio sistemático de los iodoaminoácidos y proteínas solubles de tiroides humanos, en modo especial si se trataba de individuos con bocio congénito e hipotiroidismo, y de bocios multino-

dulares eutiroideos, cuya etiología sigue siendo muy discutida. Aquí fue, sin embargo, donde encontramos las mayores dificultades, pues en nuestro centro de trabajo no disponemos de pacientes humanos, y tuvimos que conectar con los diferentes centros hospitalarios, para poder obtener las piezas quirúrgicas en las condiciones apropiadas y tras la administración de I^* al paciente. De esta forma nuestro peregrinaje por los hospitales madrileños, con la nevera a cuestas, se hizo anecdótico. A todos los que nos ayudaron nuestra máxima gratitud.

No pudimos estudiar glándulas normales (solamente una obtenida de una necropsia), pero sí bocios hiperfuncionantes y carcinomas papilares de tiroides que no habían sido estudiados por Ermans y Cols. (1968, a, b).

Pero hemos tenido la suerte de poder estudiar dos casos interesantísimos de bocio hipotiroideo congénito; con ellos y con los demás casos estudiados, creemos haber contribuido, muy notablemente a la aceptación de los conceptos que se expondrán en la Discusión y Conclusiones que aquí resumimos muy someramente.

Uno de los bocios congénitos hipotiroideos, resultó ser el primer caso descrito hasta ahora, en el que se encuentra una estructura morfológica correspondiente a un tiroides fetal en la fase de "precoloide" (Shepard, 1968) y no hay tiroglobulina 19 S, ni otro precursor de la misma o iodoproteína de la misma familia de las tiroglobulinas. Aunque en ausencia

de tiroglobulina, se ioda albúmina con formación incluso de escasas cantidades de T_4 y T_3 , pero la biosíntesis de éstas es tan ineficiente, que no se previese el hipotiroidismo ni el bocio. Asimismo, la distribución de I^* entre diferentes iodoaminoácidos de esta iodoalbúmina es tal, que hace suponer que varios casos descritos en la literatura como casos de defecto de "enzima acoplante", fueron en realidad casos en que faltaba T.G. y se iodaba otra proteína.

El otro caso de bocio congénito, se debía a la falta de un sistema capaz de oxidar el I^- e incorporarlo a la tiroglobulina, probablemente por falta de peroxidasa. Esta glándula contenía tiroglobulina, pero su coeficiente de sedimentación era de 17,5 S no de 19 S y su características inmunológicas eran normales. Tampoco había tiroglobulina 27 S. Estos datos han sido aceptados internacionalmente como prueba de que en ausencia de iodación, la T.G. humana es 17,5 S y se toman como datos que sugieren también muy fuertemente que la T.G. tiene que estar iodada para polimerizarse a 27 S.

Resultados obtenidos al estudiar varios bocios multinodulares autiroideos, han venido asimismo a apuntar en favor de esta última idea. Se encontró que en las glándulas en las que la T.G. está muy poco iodada (0,1 %) no se encuentra 27 S.

El estudio de las restantes glándulas (BMN, Ca.T. y B. hiperfuncionales) ha dado lugar a datos, en todo coincidentes con los que están saliendo de otros laboratorios: la distri-

bución relativa de I^* , encontrada en diferentes glándulas, no parece depender del proceso patológico en si, más que en cuanto éste ha podido influir o relacionarse con el grado de iodación de la tiroglobulina. En otras palabras, es el grado de iodación de la tiroglobulina lo que determina la eficiencia en la formación de T_4 y T_3 . Por debajo de una iodación del 0,1 % aproximadamente, la formación de T_4 y T_3 es muy ineficiente. Lo que queda totalmente por aclarar es el mecanismo por el cual se ha llegado al grado de iodación de la T.G. observado. Esto es especialmente cierto en el caso de los BMN en los que la iodación de la T.G. es baja. Pero es esto la causa o la consecuencia del proceso patológico que afecta a la glándula?

En un intento de ver si una deficiencia prolongada en la ingesta de iodo podía, en ratas, desencadenar el mismo tipo de alteración de los iodoaminoácidos y de proteínas solubles encontrados en los BMN, se emprendió el experimento aquí descrito. Sabemos de lo peligroso que es querer extrapolar, sin más, de roedores a seres humanos: sin embargo de todos es conocida la inmensa utilidad que la experimentación animal ha tenido en los avances de los conocimientos de los fenómenos biológicos que ocurren en el ser humano. A pesar de ello se verá que las ratas desarrollan bocio y eran metabólicamente eutiroides, mostrando alteración en la iodación de las proteínas solubles, semejantes a las obtenidas en los BMN, pero con más bajo grado de iodación de la T.G.-nativa en las ratas.

MATERIALES Y METODOS

I - DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN GLÁNDULAS HUMANAS

A - Materiales. -

Se han estudiado en total las glándulas de 14 enfermos obtenidas de los siguientes hospitales: Gran Hospital de la Beneficencia General del Estado, Hospital Clínico de la Facultad de Medicina y Ciudad Sanitaria La Paz, de Madrid. Todos los enfermos requirieron la extirpación quirúrgica parcial o total del tiroides como parte del tratamiento.

La glándula normal se obtuvo por necropsia de un paciente sin enfermedad tiroidea y fue recogida dentro de un tiempo adecuado después de su fallecimiento para que no hubiese desnaturalización de las proteínas tiroideas.

Se hizo un detenido estudio clínico diagnóstico de todos los pacientes, cuyas glándulas fueron estudiadas. Los datos más sobresalientes aparecen resumidos en la tabla nº 1. De los dos bocios congénitos se detallan la historia y pruebas clínicas específicas en los apartados correspondientes de la exposición de los resultados, dado su carácter poco frecuente.

Las piezas operatorias fueron recogidas en el quirófano, se pesaron y se tomaron allí mismo muestras para estudios de microscopía óptica y electrónica. Para los estudios

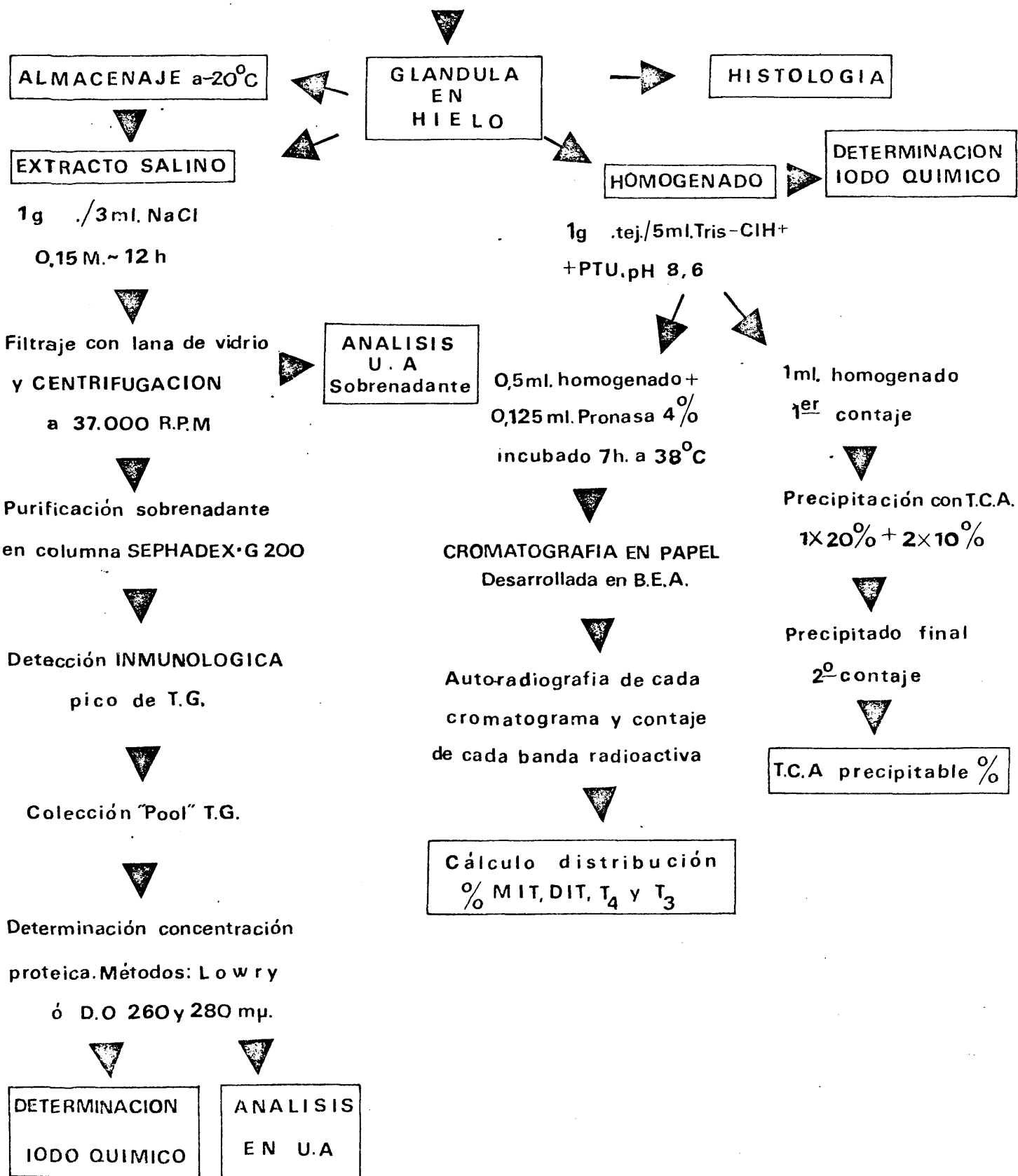
de microscopía óptica se eligieron trozos de tejido tiroideo de varias partes de la glándula, sumergiéndolos en una solución de Formaldihido al 10 %. Para los de microscopía electrónica se cogieron trozos de diversas partes de la glándula, cortados a un tamaño como de cabezas de alfiler, con cuchillas apropiadas. Fueron incluidos en una solución de Glutaraldeo al 10 % e inmediatamente guardados en hielo junto con el resto de la pieza quirúrgica, siendo así trasladados a la Sección de Estudios Tiroideos del Instituto "G. Marañón" del C. S. I. C. para los estudios ulteriores. Los métodos y técnicas de microscopía óptica y electrónica fueron ejecutados por el Dr. Alvarez-Uría del Instituto "Santiago Ramón y Cajal" del C. S. I. C.

Cuarenta y ocho horas antes de la intervención quirúrgica se le administraron a cada paciente 150 μ C de I^{125} con el fin de marcar "in vivo" las iodoproteínas en sus aminoácidos iodados.

Excepto las cromatografías y la precipitación con TCA (ác. Tricloroacético), que se hicieron en fresco en la mayor parte de los casos, el resto de los estudios se hicieron posteriormente sobre el material previamente congelado a -20° C. Esta congelación se hizo en tubos de ensayo, conteniendo cada uno, trozos de las glándulas de 2-4 g, con el fin de descongelar una sola vez únicamente la cantidad necesaria de tejido que se fuese a utilizar. Esto era importante, puesto que las descongelaciones sucesivas pueden producir alteraciones en las proteínas tiroideas, según demostraron Inoue y Taurog

ESQUEMA GENERAL DE LA METODICA SEGUIDA EN GLANDULAS HUMANAS

NaI-125 dos días
antes de operación



(1968, a).

B - Métodos. -

La metódica general seguida se expone en el esquema adjunto.

1) Extracto salino (E.S.).

Su finalidad es extraer las proteínas solubles contenidas en el tejido tiroideo. El método seguido es el descrito originalmente por Derrien y Cols. (1948). Después de disección cuidadosa del tejido peritiroideo de la pieza, se cortaron con microtomo manual trozos de tejido de 1 mm. de espesor, se sumergieron en una solución de ClNa 0,15 M, a razón de 3 ml. por gramo de tejido, dejándolos en movimiento continuo y homogéneo, mediante un agitador magnético, de 10 a 12 h en cámara fría a 4°C . A continuación se filtraron a través de gasa para eliminar restos tisulares y se centrifugó a 38.000 r.p.m. durante una hora en ultracentrífuga preparativa Spinco modelo L, utilizando el rotor nº 40. Al final de la centrifugación, se obtienen en el tubo tres capas: una con un precipitado adherido al fondo que contiene restos celulares, otra intermedia que contiene las proteínas solubles -y es el llamado propiamente extracto salino- y una tercera capa superior que contiene lípidos. Mediante una pipeta Pasteur se extrae cuidadosamente la capa central con las precauciones necesarias para no contami-

narla con las otras dos. Para más seguridad se filtra de nuevo la solución así recogida por un embudo al que se coloca un tapón de lana de vidrio; de esta forma quedan retenidos en la lana de vidrio los contaminantes de las capas superior e inferior que pudiese haber.

2) Purificación por cromatografía en columna de Sephadex G-200.

Hemos usado el método descrito por Mouriz y Stanbury (1968) partiendo de extractos salinos (E.S.) obtenidos según la técnica descrita anteriormente. Para ello se ponen a hinchar unos 15 g. de Sephadex (Farmacia, Upsala, Suecia) durante una 48 horas en agua destilada en una proporción de 30-40 ml. de agua destilada por g. de polvo a la temperatura del laboratorio, moviendo la mezcla suavemente mediante un agitador magnético. A lo largo de las 48 horas se deja precipitar el Sephadex unas cuantas veces cambiando el agua destilada cada vez con el fin de eliminar las partículas más finas. Este detalle es importante para poder tener luego un buen flujo de elución en la columna.

Utilizamos una columna de vidrio de 2,5 x 37 cms., por ser éste el tamaño óptimo según los autores citados. Una vez hinchado el Sephadex y eliminados los finos, se empaqueta en la columna a un flujo continuo y sin interrupción, dejándola luego a la temperatura del laboratorio 24 horas. Durante este tiempo se pasa a través de ella $\text{ClNa } 0,15 \text{ M}$, con lo cual el

Sephadex queda definitivamente empaquetado a la altura deseada. Si se trata de una columna que se usa por primera vez, se pasan por ella unos 0,5 ml de Azul-dextrano, con la finalidad de medir el volumen vacío de la columna, es decir, el volumen que queda excluido de las partículas de Sephadex. Tras unas 4-5 horas de equilibración en la cámara fría a 4°C , procedemos a pasar por ella muestras de 2 ml de extracto salino (E.S.) eluyéndose a continuación con ClNa 0,15 M. Contemporáneamente se separa una alícuota del E.S. para medir en ella la concentración proteica y la radioactividad total. Así conocemos las de la muestra que vamos a poner. Esto es importante para poder posteriormente calcular la recuperación de ambas en cada uno de los picos obtenidos separados en la columna.

Recogemos fracciones de 3 ml. por tubo mediante un colector automático de la casa Büchler. Habitualmente recogemos fracciones hasta un volumen de 200 ml., que suele ser el volumen total del lecho de Sephadex. En alícuotas de cada una de las fracciones recogidas se mide la radioactividad mediante un contador de centelleo líquido Tricarb de la casa Packard y la densidad óptica (D.O.) mediante Espectrofotómetro Beckman D.U. Las D.O. fueron medidas en cubetas de cuarzo a 280, 260 y 414 $\text{m}\mu$. Esta última es la D.O. específica de la Hemoglobina (Hb). Además de permitirnos localizar los picos proteicos y ver su relación con los picos radioactivos, las medidas en las dos primeras longitudes de onda nos permiten hallar la concentración proteica en cada tubo mediante la fórmula de Warburg-Kalkar (1957):

D.O. a 280 \times 1,55 - D.O. a 260 \times 0,76 = mg. de proteína/ml.

Otras veces se utilizó el método de Lowry (1951) para la determinación de la concentración proteica. Como no hemos encontrado grandes diferencias entre ambos métodos hemos usado preferentemente el espectrofotométrico anteriormente descrito, por su mayor sencillez y porque su uso supone un gasto menor de material proteico recuperado.

Tal y como se indica en el método original de Mouriz y Stanbury (1968), el pico de la T.G. aparece coincidiendo con el volumen vacío de la columna, es decir, entre los 35 y 65 ml. aproximadamente. Puede además apreciarse cómo a los máximos picos de proteína se superpone perfectamente la máxima radioactividad. Según se comprueba en el citado trabajo, la parte ascendente del pico de la T.G. está compuesto por una mezcla de T.G. de coeficiente de sedimentación 19 S y de 27 S, estando compuesto el pico descendente por T.G. nativa 19 S pura. Para estudios ulteriores hemos cogido en todos los casos la totalidad del pico, es decir, que las soluciones que manejamos tras esta purificación contienen en condiciones normales una mezcla de las T.G. 19 S y 27 S. En aquellos casos en los que interese recoger T.G. 19 S pura, basta recoger solamente la parte descendente del pico.

Entre los volúmenes 85 y 140 ml. aparece el pico de la Hb, que medimos por su D.O. específica a 414 m μ . Entre los volúmenes 145 y 200 ml aparece en las glándulas normales un último pico proteico en el cual la D.O. a 260 (especí-

fica de ácidos nucleicos) es más elevada que la D.O. a 280 mμ (específica de proteínas). Este pico corresponde a una zona donde se eluye una de las proteínas con coeficiente de sedimentación 4 S, como veremos más adelante.

3) Perconcentración de las proteínas.

Con este método conseguimos reducir el volumen de la solución de los picos proteicos obtenidos mediante el método anteriormente descrito. En la mayoría de los casos lo hemos utilizado únicamente con el pico correspondiente a la T.G.

Hemos utilizado el método de perconcentración al vacío, por su sencillez y porque no se altera la fuerza iónica de las soluciones. En una membrana de collodion (Sartorius) se introduce la solución proteica a concentrar, después se pone en un Kitasato que contiene el mismo solvente en el que va disuelto la proteína, y se conecta con una bomba que haga un vacío moderado (como el que se consigue con los sistemas de bombas que se empalman a un grifo de agua corriente). El vacío hace que el solvente difunda desde el interior de la membrana hacia el exterior, no permitiendo, naturalmente, el paso de la proteína. Si no se realiza el proceso en cámara fría, se mantiene todo el sistema sumergido en hielo.

4) Técnicas inmunológicas.

4_a) Inmuno_difusión_de_Ouchterlony.

Se utilizó esta técnica para valorar la capacidad de precipitación de diversas proteínas frente a los inmunosue-
ros experimentales, así como para determinar la presencia
de antígenos comunes a 2 ó más inmunosue-
ros, como parte fundamental en el estudio inmunológico de los
antígenos usados. Se efectuaba de acuerdo a la variante de
KAGAN Y NORMAN (1961).

El soporte de agar se preparaba según la fórmula:

- a) Agar noble Difco 40 g.
- b) Agua destilada 1000 ml.
- c) Tampón veronal 1000 ml., pH
8,6 y fuerza iónica 0,0375.

El reactivo c) correspondía a la fórmula:

- Dietil barbitúrico sódico 9 g.
- Azida sódica 0,5 g.
- ClH 1N 10 ml.
- Agua destilada 990 ml.

Se calentaba en baño María los reactivos a) y b)
hasta la completa disolución de a) y se añadía posteriormen-
te c). Se repartía en tubos de 10 ml. y se dejaba en neve-
ra a 4°C hasta su utilización.

Se cubrían portaobjetos de microscopio de 2,5 x
7 cm. convenientemente numerados y desengrasados con una

fina capa de agar al 2 %. Esta película de agar tenía por objeto facilitar la adhesión del gel de agar sobre la superficie del cristal. Una vez secos los portaobjetos, se colocan sobre una superficie perfectamente horizontal con el fin de que el agar se distribuya uniformemente sobre la totalidad del portaobjetos. Con una pipeta se vierten 3 ml. de agar al 2 % fundido previamente al baño María. Esta cantidad de agar proporciona un soporte semisólido de unos 2 mm. de espesor. Los portaobjetos con el agar se dejan solidificar manteniéndolos posteriormente en una cámara húmeda para evitar la desecación del gel. Inmediatamente se procede a labrar en el seno del agar una serie de pocillos destinados a contener el antígeno y el inmunosuero a estudiar. Para excavar los pocillos se utilizaron cilindros de material plástico.

Los distintos pocillos, central y periféricos, se rellenan con el antígeno e inmunosueros mediante capilares. Una vez llenos los pocillos con el material correspondiente, se colocaban los portas en una cámara húmeda conteniendo suero salino con mertiolato para evitar contaminaciones bacterianas. Estas cámaras húmedas se colocan en una estufa a 37° C durante 24-36 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación a 37° C las preparaciones se lavan con agua destilada y se examinan mediante una iluminación directa y sobre fondo negro, lo que permite una óptima visualización de las bandas de precipitación. Una vez examinadas en fresco, las preparaciones se sometían a un intenso lavado durante 48 horas en ClNa 0,15 M, renovan-

do éste 4-5 veces, seguido de 1 lavado en agua destilada durante unas 12 horas. Después de este último lavado se secan los portas, dejándolos a temperatura ambiente cubiertos con un papel de filtro húmedo para evitar el resquebrajamiento del agar. A continuación se procede a teñirlos. El colorante utilizado fue negro-ámido y el procedimiento se efectuó como sigue:

1º. Inmersión del porta en la solución colorante (Amido Schwarz 10 B) al 0,5 % en metanol 9 partes y ác. acético glacial 1 parte, durante 5-10 minutos.

2º. Decoloración en metanol-acético, en las mismas proporciones descritas, durante 15 minutos.

4_b) Inmunoelectroforesis.

Usamos la misma concentración de agar, el mismo buffer y el mismo tamaño de portas descritos en la técnica anterior. Lo que varía es la preparación de los portaobjetos que para inmunoelectroforesis consiste en la elaboración de canales, uno o dos destinados a contener el antisuero. Estos canales se practican en el seno del agar y en el centro del porta en sentido longitudinal, es decir, paralelamente al eje mayor del porta. La longitud de los canales es tal que abarcan teóricamente todo el espacio ocupado por los antígenos separados por la electroforesis previa. La preparación de los canales se realizó mediante varillas metálicas cilíndricas de 2 mm. de diámetro y 50 mm. de longitud. Estas barritas se colocaron sobre el portaobjetos (en el lugar correspondiente, gracias a una plan-

tilla que se situa debajo del cristal) antes de verter el agar fundido. Este ocupa toda la superficie del porta a excepción del espacio ocupado por la barrita que, al solidificarse el agar y retirarse mediante un imán deja su vaciado en el seno del agar en forma de canal. La excavación de pocillos se hizo exactamente igual que para la inmunodifusión y mediante cilindros huecos de material plástico. Los pocillos más utilizados fueron en este trabajo un canal central y dos pocillos laterales.

Los portaobjetos preparados con pocillos y canales se colocan en una cubeta de electroforesis ELPHOR. Se establecen las conexiones, con papel de filtro Whatman nº 3 para conexiones, de 3 cm. de ancho, cuidando de mantener las distancias entre los extremos del papel constantes y procurando que el contacto del papel con el agar sea lo más íntimo posible. Una vez colocados se rellenan los pocillos con los antígenos a estudiar y se someten al paso de la corriente eléctrica. Para limitar la duración de la electroforesis se utilizó como indicador el azul de bromofenol al 1 %.

Concluida la electroforesis, el canal central se rellena con el inmunosuero correspondiente mediante un capilar y se introduce en estufa a 37°C donde se mantienen 24-36 horas.

Finalizado el tiempo de inmunodifusión, se estudian las preparaciones en fresco. La visualización de las bandas de precipitación, resultado de la reacción obtenida en el seno

del agar entre los antígenos separados por electroforesis y los anticuerpos contenidos en el canal, se realizó mediante iluminación indirecta sobre fondo oscuro.

Sistemáticamente se efectuaron inmunolectroforesis de cada sistema a estudiar por triplicado para una mayor seguridad en la interpretación de los resultados.

Para la tinción de proteínas, se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente.

5) Electroforesis en acetato de celulosa.

Se realizó electroforesis en tiras de poliacetato de celulosa Sepraphora III en una cámara de electroforesis Gelman (modelo 51101). Se usó un generador de corriente EEL (Evans Electro Selenium LTD) así como un EEL scanner para realizar el registro gráfico en función de la D.O. de las bandas.

El tamón empleado fue buffer veronal pH 8,2, cuya composición se ha descrito antes.

Las muestras problema se aplicaron con un aplicador de muestras Gelman, previamente cargado con micropipeta.

Las tiras de poliacetato son sumergidas en el buffer

mismo que llena la cámara hasta que queden completamente embebidas dádoles su textura de gel. A continuación son secadas en un papel de filtro y aplicadas las muestras.

Las tiras se colocan en la cámara previamente rellena con buffer, a 4°C , y sujetas mediante una barras imantadas. Se conecta la cámara para que comience la electroforesis a una intensidad de 1,5 amp. por tira.

Como indicador del tiempo de electroforesis se coloca, a la altura en que se aplicó la muestra, sobre otra tira preparada de idéntica manera, una gota de tinte de referencia RBY. Durante el transcurso de la electroforesis se separan tres colorantes, amarillo, rojo y azul, señalando el final de aquella, el momento en que la mancha roja llega al otro extremo de la tira.

Las tiras son sacadas de la cámara y colocadas en la solución de colorante de Ponceau (500 mg. en 100 ml. de TCA al 5 %) durante cinco minutos.

El procedimiento para volver transparente la tira soporte después de la tinción consta de:

- 3 lavados de 3 minutos con ác. acético al 5 %.
- 3 lavados con metanol para eliminar el colorante no fijado.
- 1 baño en ác. acético glacial-metanol (10:90) durante 5 min.

Las tiras colocadas sobre un soporte de vidrio son colocadas en una estufa a 40°C hasta su transparencia completa.

6) Valoración de proteínas.

Como se ha indicado ya en algunos de los casos se utilizó el método de Lowry (1951). El principio de este método consiste en formar un complejo cobre-proteína, al hacer reaccionar una solución de proteínas con un reactivo alcalino del cobre. El complejo reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ác. fosfotúngstico y fosfomolibdato). El fosfomolibdato se reduce por el complejo cobre-proteína para dar un color azul a pH = 10.

Reactivos que se necesitan:

A.- CO_3Na_2 al 2 % en NaOH 0,1 N.

B.- $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 5 % en Tartrato sódico-potásico al 1%.

C.- Solución alcalina de cobre. Se prepara el mismo día del ensayo mezclando 50 ml. del reactivo A con 1 ml. del reactivo B.

D.- Solución cobre-carbonato, que es la misma que la solución C pero preparada con la omisión del NaOH en el reactivo A. Únicamente se utiliza en los casos en que la proteína no es soluble y para su solubilización ha sido necesario digerirla con álcali.

Para la solución standard se prepara una solución stock de albúmina cristalizada (250 mg / 25 ml de agua destilada) la cual se guarda congelada. El día del ensayo se prepara la solución standard diluyendo 1 ml. de la solución stock hasta 20 ml. con agua destilada. Esta solución tendrá 0,5 mg

de proteína por ml. La proteína a analizar, o la standard de albúmina, están contenidas en 1 ml. Se pipetea 5 ml del reactivo C en cada tubo y se mezclan y a continuación se pipetea 0,5 ml del reactivo de Folin diluido 1:1 (5 ml. de Folin en 5 ml de agua destilada). Se deja desarrollar el color durante media hora y se lee en espectrofotómetro (Coleman) a D. O. de 500 a 700 mμ.

7) Análisis en ultracentrífuga analítica (U.A.), Determinación del coeficiente de sedimentación (C.S.).

Los coeficientes de sedimentación de las proteínas del tiroides solubles en CNa 0,15 M, se determinaron a partir de coeficientes de sedimentación aparentes y midiéndolos luego a diferentes concentraciones proteicas para cada una de las proteínas. Se usó una ultracentrífuga analítica Beckman modelo E por el método de velocidad de sedimentación (Chervenka, 1969). Generalmente se usó una velocidad media de 56.000 rpm, a 20°C de temperatura. Se empleó un rotor An-D con célula standard de doble sector de aluminio de 12 mm. y 4°. Previamente se calibró el termistor; esto se hizo representando las lecturas del sistema de medida del instrumento frente a las de un termómetro contrastado, insertado en el rotor en el orificio donde se coloca la célula. El rotor enfriado se calentó lentamente con aporte térmico.

Por definición, S (coeficiente de sedimentación "aparente") es la velocidad de transporte de sedimentación por unidad de campo centrífugo

$$S = \frac{dr / dt}{\omega^2 r}$$

donde ω es la velocidad angular del rotor y r la distancia al centro de rotación. Tomando diversos valores de r para distintos tiempos y la forma integrada de la ecuación:

$$S = \frac{1}{\omega^2} \frac{\Delta \ln r}{\Delta t}$$

tenemos que una representación de $\ln \bar{r}$ frente a t nos debe dar una recta cuya pendiente nos permite calcular el valor de S para una concentración determinada.

Para medir las distancias desde el centro de giro a la zona límite entre el sobrenadante y la región en que la concentración en macromoléculas es uniforme, se usó el sistema óptico de Schlieren. Dicho sistema está compuesto por una lente cilíndrica con el eje óptico paralelo al gradiente de concentración, el diafragma de Schlieren y otros componentes simples que hacen que los rayos que atraviesan la zona de discontinuidad óptica sean desviados lateralmente, produciendo una imagen de la rendija de la fuente luminosa deformada en la zona ocupada por el gradiente. Esa deformación es proporcional al valor de $\frac{dc}{dx}$. El efecto conseguido es una curva gaussiana equivalente a una representación de $\frac{dc}{dx}$ en función de x .

A partir de los valores de los coeficientes de sedi-

mentación aparentes (S), así obtenidos para las diferentes concentraciones de una misma proteína, se ajusta por mínimos cuadrados la mejor recta para una regresión lineal de los valores de S en función de la concentración de proteína. Se realiza la extrapolación a concentración 0 (dilución infinita) para obtener el valor de $S_{w,0}^0$. Este valor extrapolado a su vez a condiciones "normalizadas", que son las de un disolvente que tenga la viscosidad y la densidad del agua a 20°C .

$$\text{Coeficiente de sedi-} = S_{20\ w}^0 = S_{20,\text{d}}^0 \cdot \frac{\eta_{\text{d},20}}{\eta_{\text{w},20}} \cdot \frac{1-\bar{V} \rho_{20\text{w}}}{1-\bar{V} \rho_{20,\text{d}}}$$

mentación real

El término $\frac{\eta_{\text{d},20}}{\eta_{\text{w},20}}$ es la relación de viscosidades entre el disolvente y el agua a 20°C que se obtuvo experimentalmente en un viscosímetro de Ostwald. \bar{V} es el volumen específico parcial del soluto, $\rho_{20\text{w}}$ la densidad del agua a 20°C y $\rho_{20,\text{d}}$ la densidad del disolvente a 20°C obtenida de la recta, densidad de disolución frente a concentración determinada por el cálculo de \bar{V} .

Los cálculos del coeficiente de sedimentación real se llevaron a cabo en programas que se procesaron en una Olivetti Programma P-102.

8) Determinaciones de iodo.

a) Valoración de I^* .

a₁) Contaje de I^* .

"In vivo": El contaje de la región tiroidea de los enfermos y las ratas se hacen en un contador de centelleo, para emisores gamma. Los resultados se expresan como % de la dosis radioactiva administrada captada por el cuello, tanto en el caso de los animales experimentales como en el caso de los pacientes. Simultáneamente se dosifica la radioactividad en una alícuota de la dosis separada previamente (standard), determinando su radioactividad al mismo tiempo que la de los problemas. Con ello se corrigen las variaciones debidas a la desintegración radioactiva y a variabilidad de los equipos de medidas.

"In vitro": En el caso de los contajes de muestras lípidas y sólidas el volumen de los problemas y de las standards ha de ser el mismo pues de lo contrario se introducen errores de contaje. Cuando se contaron muestras "in vitro" se hizo en un contador automático de dos canales Tricarb de la casa Packard utilizando siempre tubos con el fondo de igual forma puesto que puede haber errores debidos a la distinta geometría de los tubos empleados.

a₂) Determinación de la composición porcentual en iodoamino-ácidos tiroideos marcados con I^* .

- Homogenización de tiroides.- En el caso de glándulas huma-

nas se añadieron 5 ml. de buffer (Tris-ClH exento de iodo pH 8,6 que contenga PTU 10^{-3} M) por g. de tejido cortado lo más finamente posible con tijeras. Se procede después a la homogenización con Potter de vidrio, homogenizando con motor, en frío. Se separan alícuotas de 0,2 ml. por duplicado, para la determinación química del contenido total de iodo por glándula y se toman alícuotas de 0,5 ml por duplicado o triplicado para la digestión proteolítica.

Las cantidades tomadas y proceder con las ratas se describe más adelante.

- Digestión proteolítica.- La técnica que se sigue está basada en las descritas por Tong y Chaikoff (1958) y Mayberry y Astwood (1960), teniendo en cuenta las observaciones de Rosenberg y Cols. (1964). A las alícuotas tomadas del homogenizado se añaden 0,1 ml de Pronasa (Calbiochem) al 4 % en el mismo buffer arriba descrito y unas gotas de tolueno, para evitar el desarrollo de contaminaciones bacterianas; a continuación se introduce en estufa a 37°C durante 7-8 horas para digestión.
- Separación cromatográfica.- Terminada la digestión se agita el hidrolizado intensamente para conseguir una suspensión homogénea. Se toma entonces una alícuota de la misma y se transfiere a una tira de papel Whatman nº 3 de 2,5 cm. de ancha por 30 cm de larga, si se trata de identificar solo compuestos radioactivos (en el caso de que se quiera identificar simultaneamente compuestos químicos midiendo ^{127}I se

usa papel Whatman nº 1). Con anterioridad se han añadido al origen del cromatograma 10 μ l de una solución que contiene los transportadores (carriers) adecuados; esto se hace únicamente cuando sólo queremos ver distribución porcentual de iodoaminoácidos marcados y obviamente no debe de hacerse si también queremos determinar los valores químicos de los iodoaminoácidos. La solución de transportadores (carriers) contiene todos los compuestos iodados del tiroides que tratamos de identificar y está compuesto por L-T₄ (8 mg.), T₃ (8 mg.), IK (2 mg.), MIT (2,5 mg), DIT (3,5 mg.), PTU (4 mg.) en 2 ml de metanol-amoniaco 2 N (3:1). El PTU se añade para evitar desiodación de estos compuestos. Se coloca la tira de papel en una caja cromatográfica de forma rectangular, añadiendo a continuación el solvente cromatográfico que se use. En nuestro caso hemos usado invariablemente como solvente n-butanol-etanol - 1 N amoniaco (relación de volúmenes, 5:2:1), por ser el que da mejores separaciones simultáneas de MIT, DIT, T₃, T₄ y I⁻. Se coloca la caja cromatográfica de tal forma que los compuestos digeridos emigren ascendentemente con un ángulo de inclinación de unos 20°. De esta forma se mantiene unas 16 horas, al cabo de este tiempo, observando la altura que alcanzó el frente cromatográfico, se sacan las tiras y se secan con un chorro de aire caliente.

- Localización, identificación y cuantificación de los compuestos iodados.- La propiedad de los compuestos radioactivos de impresionar placas fotográficas la utilizamos para la localización de las manchas radioactivas en las cromatografías.

Para ello colocamos el papel cromatográfico, en la oscuridad, en contacto con película radiográfica; después del tiempo necesario, que depende de la radioactividad de la muestra, se revela dicha película, con lo cual tenemos localizadas las manchas radioactivas en el papel cromatográfico.

Para identificar el compuesto químico a que corresponde cada zona radioactiva, delimitada previamente mediante autorradiografía, se procede a la tinción directa de los mismos. Se usa primero una solución ácida de cloruro de Paladio al 0,04 % con lo que aparece una mancha marrón correspondiente al yoduro; a continuación se alcaliniza el cromatograma con carbonato sódico al 5 % y se procedió a la tinción de los iodoaminoácidos, añadiendo una mezcla que consta de dos partes de ácido sulfanílico al 0,5 % y una de nitrito al 5 %. Esta mezcla se prepara inmediatamente antes de teñir, reaccionando rápidamente con formación de diazosulfamílico. Aparecen las manchas rosadas de los iodoaminoácidos, que tienen el siguiente orden en el cromatograma desarrollado en n-butanol-etanol-amoniaco 1 N: origen (OR), DIT, MIT, I^- , T_4 , T_3 y Frente (fr). Llamamos origen, al material con $R_f = 0$.

Localizadas e identificadas las bandas radioactivas, se recortan y se cuenta su contenido en I^* en el contador de centelleo. La suma de la radioactividad encontrada en la totalidad del cromatograma, se toma como 100 % y la proporción de la misma que hay en los distintos compuestos, se expre-

sa en % de esta radioactividad total.

a₃) Precipitación del I^* con ácido tricloroacético (TCA).

Una muestra de homogenado de tiroides, o de plasma, se contó en contador de centelleo y tras tres precipitaciones con TCA, una al 20 % y dos al 10 % se contó de nuevo al precipitado final. De ambos contajes se calculó el % de la radioactividad precipitable con TCA que representa el I^* organificado, ya que el TCA precipita específicamente las proteínas. Ha de cuidarse en hacer las tres precipitaciones con decantación del sobrenadante en el mismo tubo de contaje. Para obtener el precipitado se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 minutos y como hemos indicado se repite tres veces la operación únicamente variando la concentración que usamos las dos últimas veces.

b) Valoración de I^{127} .

El método para valorar el iodo químico en pequeñas concentraciones consiste en observar la velocidad de reducción del sulfato cérico por el anhídrido arsenioso. Esta reacción es muy lenta pero puede ser catalizada por el iodo inorgánico de tal forma que la velocidad de la reacción es proporcional a la cantidad de iodo. La decoloración de la forma oxidada de cérico (amarilla) a ceroso (incolora) permite seguir la marcha de la reacción en un espectrofotómetro.

b₁) Método general.- Siguiendo la técnica descrita por Benotti

y Benotti (1963), con algunas variantes que se han introducido en nuestro laboratorio, se ha logrado afinar la precisión del método, así como aumentar enormemente la velocidad de las determinaciones. El método consiste en digerir las muestras directamente en baño de arena a $105-110^{\circ}\text{C}$ en presencia de un ácido muy oxidante, el ácido clórico, durante el tiempo necesario para destruir toda la materia orgánica y convertir todos los compuestos iodados a forma inorgánica, (iodato). La digestión se realiza generalmente en 3 ml. de ClO_3H y como indicador final de la reacción, se adiciona una solución de cromato sódico a una concentración final de 1 mg / 3 ml de ácido clórico. Al final de la digestión se observa con toda claridad la aparición de cristales de óxido de cromo, momento en el que las muestras se sacan del baño de arena. La preparación del ácido clórico se efectúa en el laboratorio y se consigue como resultado de la reacción de ClO_3K y el ClO_4H , que se lleva a cabo a ebullición; después la mezcla reaccionante se deja a -20°C durante 12 h., al cabo de las cuales se filtra por un papel Whatman n^o 1, obteniéndose una concentración aproximada de ClO_3H del 28 %.

A los digeridos se les añaden 10 ml de agua recién destilada y se adicionan 2 ml de una solución de ácido arsenioso. Esta está preparada con 3 g. de As_2O_3 y 87,5 g. de ClNa en un matraz en el que previamente se han disuelto 2 g. de NaOH en 200 ml de agua destilada, y sobre la mezcla se añade una solución de 764 ml de SO_4H_2 en un litro de agua destilada y se lleva después a dos litros con agua destilada.

El digerido, disuelto en 10 ml de agua y 2 ml de arsenito se introduce en un baño de agua a 32°C ; se agregan 0,3 ml de una solución de sulfato cérico-amónico. Esta se prepara con 97 ml de SO_4H_2 diluidos hasta un litro de agua destilada a la que se añaden 22 g. de $(\text{SO}_4)_4\text{Ce}(\text{NH}_4)_4$ (sulfato cérico amónico), controlando el tiempo. A los 32 minutos aproximadamente se toma una fracción de la mezcla, que se colorimetrea a 410 m μ en un colorímetro Coleman.

Con cada serie de problemas se debe diferir una serie de standards. Como standards se emplean distintas soluciones de IO_3K . Generalmente utilizamos, respectivamente, un blanco y 0,02, 0,04 y 0,06 μg de I contenidos en 1 ml de agua destilada. Para conseguir el éxito del método es necesario utilizar reactivos de la mayor garantía internacional, así como observar una limpieza absoluta en el material utilizado e incluso un laboratorio totalmente aislado y dedicado exclusivamente a la realización de estas determinaciones. Cualquier contaminación es delatada por la rápida decoloración de las standards.

Según sea la cantidad de iodo que supongamos tienen los problemas a valorar, podremos introducir diversas variaciones sobre el método general.

b₂) Determinación de I^{127} y PBI^{127} en plasmas.-

- I^{127} Total: Se utilizan 0,5 ml de plasma para cada determinación y se sigue el método general sin introducir ninguna

variación.

- PBI¹²⁷ o iodo ligado a proteínas plasmáticas: 0,5 de plasma se precipitan con 10 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % en el mismo tubo que se va a utilizar posteriormente para la digestión; después de dejar reposar el precipitado durante 15 minutos, se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante, y el precipitado, que contiene todas las proteínas séricas portadoras de compuestos iodados, se lava con otros 10 ml del mismo ácido, con posterior centrifugación y decantación del sobrenadante. Con el precipitado en presencia de 3 ml de ácido clórico, se comienza la digestión continuando el método general.

b₃) Determinación de iodo en tiroides.- En nuestro caso hemos analizado el contenido en iodo de las glándulas tanto humanas como animales, usando alícuotas del homogenado hecho con Tris-ClH (0,2 ml).

Las alícuotas de los homogenados se digieren con 1,5 ml de ácido clórico. Las standards para este tipo de determinación son: 0,0 (blanco) 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 µg de I. Estas standards también se digieren con 1,5 ml de ácido clórico. Una vez terminada la digestión se diluyen las muestras con 10 ml de agua destilada. De aquí se toman 0,5 ml, se le añade luego 10 ml de H₂O, 2 ml de arsenito y 0,5 ml de sulfato cérico-amónico. A partir de este momento se continua el método general, con la única variación de colorimetrar las mues-

tras a tiempos más cortos (aproximadamente 16 minutos) después de la adición de cérico, puesto que el contenido en iodo de los tiroides es mayor que el del plasma.

b₄) Determinación de iodo en dietas alimenticias para ratas.

La gran cantidad de materia orgánica que éstas contienen, obliga a realizar la digestión con 4 ml de ácido clórico, a pesar de las cantidades tan bajas de muestra que se utilizan para la valoración: 20 mg, 20 mg y 60 mg. Las standards que se emplean para estas determinaciones son las mismas que las del método general, continuando el resto de la valoración de la misma forma. Si el contenido de iodo de las muestras es muy bajo, se pueden utilizar standards más bajas, efectuando las lecturas en el colorímetro a tiempos más largos.

b₅) Determinación de la cantidad de iodoaminoácidos tiroideos separados por cromatografía en papel.

La homogenización y digestión proteolítica de los tiroides se llevan a cabo tal y como se ha descrito anteriormente, para la cromatografía de compuestos tiroideos radioactivos. Naturalmente hay que extremar las precauciones de limpieza y cuidar de que ninguno de los materiales empleados puedan estar contaminados con trazas de iodo.

La separación cromatográfica se lleva a cabo en tiras de papel Whatman nº 1 de 3,5 cm. de ancho usando como solvente cromatográfico BEA (n-butanol-etanol- 1N amoníaco). El proceder es idéntico que el descrito para las cro-

matografías radioactivas pero hay que tener las siguientes precauciones: 1º) No añadir transportadores (carriers) al papel, pues entonces valoramos además del contenido en iodoaminoácidos del tiroides el contenido en los mismos de la solución de transportadores. 2º) Usar BEA que solo se utiliza en estas cromatografías para evitar contaminaciones. 3º) Proceder al desarrollo de la cromatografía inmediatamente después de la hidrólisis proteolítica (Rosenberg y Cols., 1964) y poner las muestras en el origen del cromatograma en cámara oscura con luz roja, para evitar desiodaciones (G. Morreale de Escobar y Cols., 1963).

Conviene valorar también el contenido en iodo de las glándulas mientras estas se están hidrolizando, para calcular de antemano cual es la cantidad de digerido que conviene cromatografiar para que los distintos compuestos iodados, tengan una cantidad de iodo está comprendido en la serie de standards utilizadas.

Las standards llevan una cantidad de papel Whatman nº 1 lo más parecida posible a la de los problemas correspondientes, añadiéndose la solución standard sobre dichos papeles, Se digieren con 3 ml de ácido clórico; a los digeridos se les añaden 10 ml de agua destilada, 2 ml de arsenito y 0,5 ml de cérico, leyendo a distintos tiempos según sea el contenido en iodo.

Los resultados se leen en μg de I presente como MIT, DIT, etc. en las correspondientes curvas standard y a

partir de ellos se obtiene la cantidad de iodo en cada compuesto por glándula así como la distribución porcentual de los mismos.

II - ESTUDIOS REALIZADOS EN ANIMALES EXPERIMENTALES

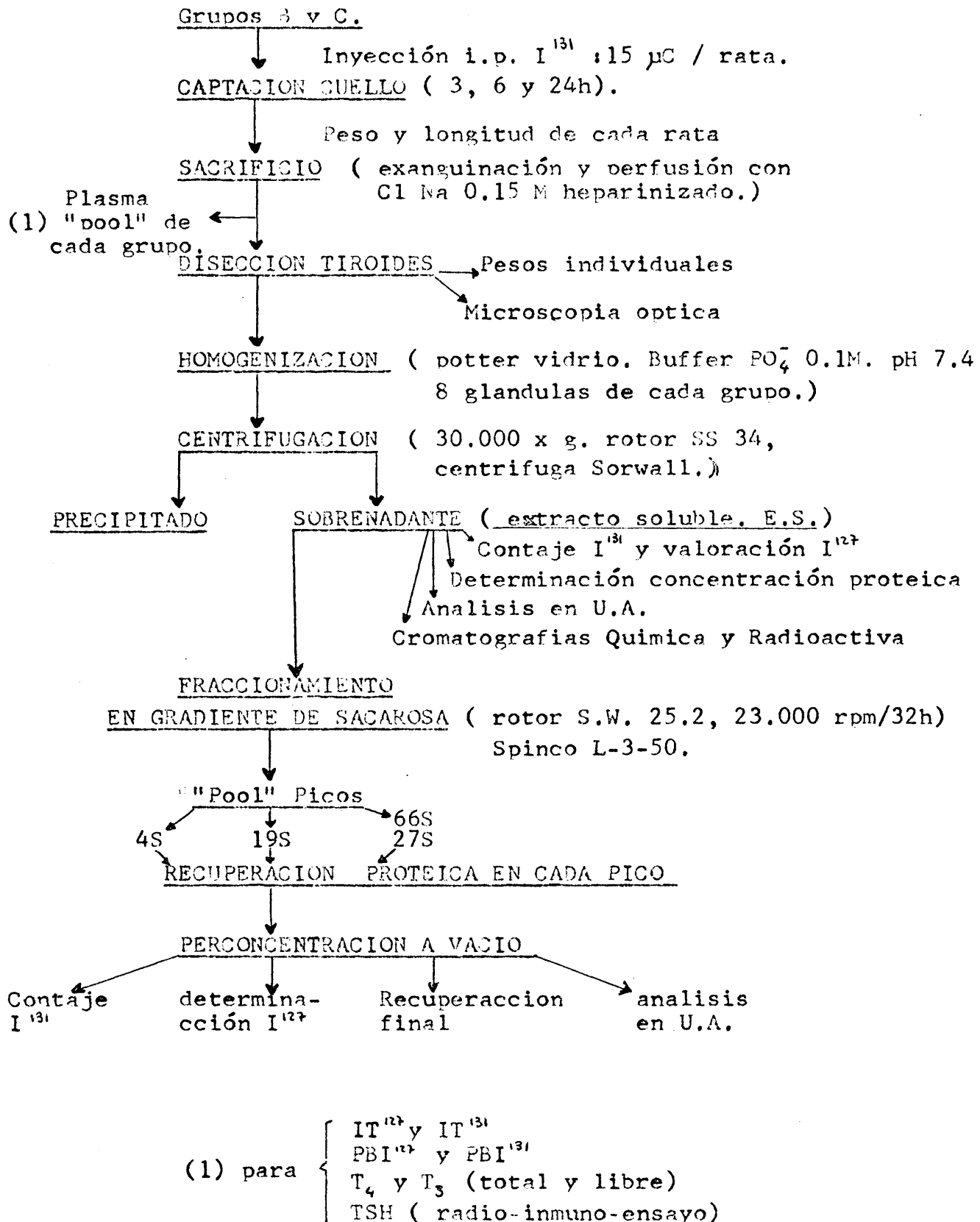
A - Materiales. -

Hemos utilizado para nuestro experimento ratas machos de la raza Wistar de nuestro criadero, recién destetadas. A un grupo de ellas (B) se les sometió desde el destete y durante 13 meses a una dieta pobre en iodo de gran valor calorigénico y equilibrada en principios inmediatos y vitaminas. Su composición es la siguiente (Remington, 1936, 1937):

Harina de maíz	6.000 g.
Levadura de cerveza	1.000 g.
Gluten de trigo	2.500 g.
CINa	100 g.
CO ₃ Ca	100 g.
Agua destilada	c.s.

El contenido en iodo de esta dieta es entre 0,05 y 0,09 µg por g. de dieta.

ESQUEMA GENERAL DE LA METODICA SEGUIDA EN RATAS



Simultaneamente se puso un grupo control de ratas (C), igualmente recién destetadas, a idéntica dieta, pero suplementada con IO_3^- . El contenido en iodo de esta dieta fue de 1,7 μg por gramo de dieta. Estas ratas se mantuvieron a esta dieta durante 13 meses. Ambos grupos tomaron como bebida agua destilada "ad libitum".

Puesto que las variaciones de temperatura ambiental pueden ejercer un gran efecto en el metabolismo de los animales, hemos tenido cuidado en mantener la temperatura ambiente constante entre 20-24°C, que es la óptima para los animales empleados en este experimento.

B - Métodos. -

La metodología general seguida se expone en el esquema adjunto.

Las determinaciones de T_4 y T_3 totales y libres fueron hechas en el Boston Medical Inc. por el Dr. Benotti, según técnica de Sterling (1970) modificada por Benotti.

Las determinaciones de TSH en plasma de rata fueron realizadas por la amabilidad de la Dra. M.D. García por un radioinmunoensayo desarrollado en nuestro laboratorio (García y Cols., 1970). Los resultados están expresados en unidades de rata arbitrarias, puesto que no hay standard internacional de TSH de rata. 1 U = 1 hipófisis de rata nor-

mal adulta; por bioensayo corresponde a 0,21 U de la standard internacional de TSH bovino.

Todos los métodos ya han sido descritos excepto el de la purificación de las iodoproteínas, que se utilizó gradiente de sacarosa por ser ésta la técnica más idónea cuando se trabaja con las pequeñas cantidades de proteína, que se encuentran en los E.S. de los tiroides de rata.

a) Separación de iodoproteínas en gradiente de sacarosa.-

Según técnica original de Martín y Ames (1961).

El proceder es el siguiente: se preparan en buffer fosfato pH = 7,44 dos soluciones de sacarosa (Meck), una al 5 % y otra al 40 %, con la finalidad de conseguir un gradiente de concentración, de densidad continua desde el 40 % en el fondo del tubo al 22,5 % en la superficie del mismo. Para ello utilizamos un mezclador diseñado por la casa Büchler, manteniendo la parte que contiene la solución al 40 % en movimiento continuo y homogéneo mediante un motor con un astago que lleva un fino sistema de aspas, que llega al fondo del tubo. El tiempo óptimo para conseguir un buen gradiente oscila entre unos 15-20 minutos por cada uno de los tubos. A partir de este tiempo éstos se mantienen en cámara fría a 4°C durante 4-6 horas para su estabilización y ambientación. A continuación se procede a colocar las muestras en cada uno de los tubos. En nuestro caso éstas eran alícuotas de los E.S. de los tiroides B o C. La aplicación de la muestra ha de

hacerse cuidadosamente para no disturbar el gradiente, de formar que sea bien visible la interfase que queda entre la solución de proteínas y la porción superficial del gradiente.

Se usan tubos de nitrocelulosa con capacidad para 50 ml por tubo en un rotor S.W-25.2. Se centrifugó a 23.000 rpm durante 32 horas en una ultracentrífuga preparativa Spinco modelo L-3-50. Con este régimen hemos obtenido una buena separación de las iodoproteínas tiroideas, como podrá verse en la exposición de los resultados.

Para recoger el gradiente una vez centrifugado, introducimos una aguja larga hasta el fondo del tubo, conectándola mediante un cateter al colector automático de fracciones, donde recogimos aproximadamente 1 ml por cada tubo. A continuación se cuenta la radioactividad de cada uno de los tubos según la forma ya expuesta, y se mide su D.O. a 280 m μ en un espectrofotómetro Beckman modelo D.U.

RESULTADOS Y COMENTARIOS

I - ESTUDIOS REALIZADOS EN GLANDULAS HUMANAS

A - Generalidades.-

En la Tabla nº 1 se detallan los resultados globales más característicos de los 14 enfermos cuyas glándulas han sido estudiadas. En la columna correspondiente a "Estado funcional del enfermo", queremos expresar el estado general del organismo desde el punto de vista de la situación metabólica periférica, tal y como se aprecia en la exploración clínica, sin tener en cuenta la alteración que afecta a su tiroides. Esta situación metabólica periférica está reflejada en el metabolismo basal en aquellos enfermos que se ha determinado. Como se ve, en total son: 9 eumetabólicos (7 hembras y 2 varones), 3 hipermetabólicos (3 hembras), y 2 hipometabólicos (1 hembra y 1 varón).

Las dos columnas siguientes se refieren a datos sobre el tiroides de cada enfermo. En primer lugar aparece la morfología de la glándula (el enfermo nº 12 padecía una enfermedad de Graves- Basedow, el nº 13 un bocio congénito por defecto de oxidación e incorporación del I^- a la tiroglobulina y el nº 14 un bocio congénito debido a una falta de tiroglobulina -el estudio de los enfermos nº 13 y 14 constituyen dos apartados importantes de esta tesis-). En segundo lugar aparecen las captaciones porcentuales de una dosis trazadora de I^{131} al cabo del tiempo o tiempos especificados en cada caso. Las captaciones de los enfermos nº 1 al 7 (BMN) se encuentran, en mayor o menor grado, en cifras superiores a las normales (en nuestro país se dan como tales una captación de $\sim 7\%$ a las 2 h y una captación del $\sim 40\%$ a las

TABLA Nº 1

Paciente Nº	Sexo Edad	Estado Funcional del enfermo	M.B. (1)	TIROIDES		PLASMA		
				Morfología de la glándula	Captación Radioiodo % de la dosis	Iodo Total µg/100 ml	PE-I µg/100ml	Colesterol mg/100 ml
1	V. 33	Eumetabólico	-(11)	B.M.N. (11)	2h=25 % 24h=48 %	8,0	6,4	165
2	H. 64	"	12	"	6h=69 % 24h=65 %	5,4	4,6	200
3	V. 30	"	16	"	24h=57 %	5,9	5,5	-
4	H. 49	"	-	"	2h=27 % 24h=53 %	7,0	6,6	180
5	H. 62	"	-	"	24h=58 %	5,5	4,9	-
6	H. 36	"	11	"	6h=45 % 24h=64 %	6,4	5,9	131
7	H. 39	"	-	"	24h=57 %	5,9	5,5	-
8	H. 65	"	-	Carcinoma Papilar	2h=8 % 24h=30 %	6,2	5,8	-
9	H. 60	"	-	Carcinoma Papilar	2h=6 % 24h=20 %	4,4	3,2	-
10	H. 42	Hipermatabólico	121	Nódulo Solitario Autónomo	24h=71 %	12,4	11,8	141
11	H. 45	"	102	B.M.N.	24h=86 %	>20	>20	121
12	H. 23	"	-	Bocio Difuso	24h=78 %	17,0	15,2	112
13	H. 16	Hipometabólico	-	Bocio Difuso	2h=53 %	1,2	0,8	480
14	V. 16	Hipometabólico	-	Bocio Difuso	2h=56,8 % 18h=88,3 % 232h=65,2 %	5,0	3,1	280

(1) MB = Metabolismo Basal.

(11)- = No Determinado.

(111)B.M.N.= Bocio Multinodular.

Algunos datos generales de los distintos enfermos cuyas glándulas han sido estudiadas en el presente trabajo. En la columna correspondiente a "Estado funcional del enfermo", queremos expresar la situación metabólica de su organismo.

Para ayudar a la selección de cada enfermo, se emplearon las técnicas más habituales para este fin, disponibles en los centros hospitalarios donde los enfermos estaban ingresados.

24 h). Los pacientes nº 8 y 9 presentan cifras normales y los nº 10, 11 y 12 netamente aumentadas. Las captaciones tan rápidas y elevadas observadas en los pacientes nº 13 y 14 son una de las características diagnósticas más peculiares de la cinética del radioiodo en estos cuadros, cuyo estudio más completo se detallará más adelante (apartado C del presente capítulo).

En las tres últimas columnas se expresan los parámetros que más habitualmente se miden en el plasma de los pacientes con enfermedades del tiroides. Los valores de IT (Iodo total) y PBI (Iodo ligado a proteínas) corresponden a iodo estable o I^{127} . Las cifras que se admiten como normales en este laboratorio para PBI^{127} oscilan entre 3,5 y 8 μg por 100 ml de plasma, siendo el IT^{127} superior a estos valores en 1-2 μg por 100 ml. Los pacientes nº 1 al 9 tienen cifras normales, los nº 10 al 12, aumentadas, el nº 13 francamente bajas y el nº 14 aunque tiene cifras en el límite bajo de la normalidad, los niveles de hormonas circulantes son también bajos, como se verá más adelante. Como puede apreciarse en todos los casos, excepto en este último, ambos parámetros reflejan muy bien el estado de cada enfermo indicado en la columna correspondiente a "Estado funcional". Al expresar los resultados en muchas ocasiones, no se hace referencia a la alteración concreta que afecta al tiroides, sino a cada uno de estos tres estados.

B - Bocios multinodulares tóxicos y carcinomas de tiroides.

1) Distribución del I^* entre diversos iodoaminoácidos y su re-

Distribución porcentual del I^* entre los diversos compuestos iodados del tiroi-
des a las 48 h. de la administración del trazador, y correspondientes a los
pacientes descritos en la Tabla N^o 1. Los datos indicados son los valores
medios obtenidos a partir de tres o más cromatografías del hidrolizado de una
muestra de cada glándula.

Paciente N ^o	Or [*]	Ioduro [*]	MI [*] T	DI [*] T	T ₄ [*]	T ₃ [*]	Fr.
1	3,8	4,6	36,7	45,2	8,4	0,4	0,7
2	3,5	4,6	69,5	19,9	1,9	0,4	0,2
3	4,3	13,2	55,9	15,8	3,6	1,0	4,1
4	4,2	8,7	63,6	19,4	2,4	0,2	1,3
5	3,5	6,4	52,1	34,4	3,3	0,2	0,1
6	2,5	4,1	52,8	36,4	2,9	0,7	0,5
7	4,9	10,2	56,0	18,8	3,6	1,0	3,9
8	4,0	7,5	55,2	17,3	8,6	3,4	3,8
9	3,9	8,1	45,3	28,2	7,6	3,0	3,7
10	5,9	6,7	25,1	35,9	21,5	3,3	1,7
11	7,5	9,0	22,6	32,4	24,1	4,4	0,1
12	3,2	10,6	25,0	41,6	14,3	3,6	1,5
13	1,5	97,0	-	-	-	-	0,5
14	14,6	9,5	17,0	47,0	2,0	-	-

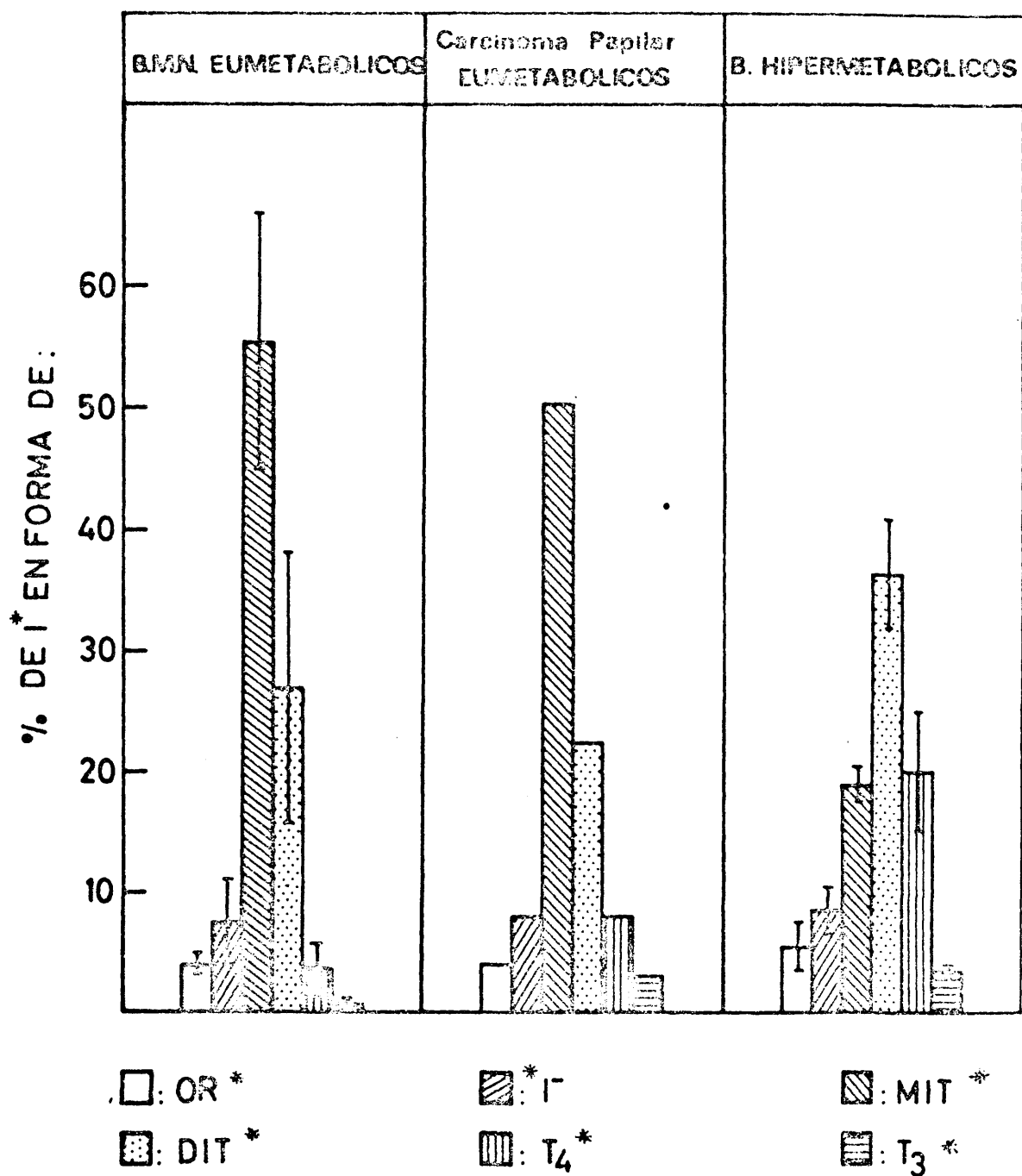


Figura nº 1.

Representación gráfica de la distribución porcentual del I^* entre los iodoaminoácidos marcados, correspondiente a los datos expresados en la Tabla nº 2. Se representan valores medios \pm d.s. En el caso de los carcinomas papilares eumetabólicos no se pudo representar la d.s. por carecer de suficientes datos.

lación con la iodación de la tiroglobulina.

En la Tabla nº 2 aparecen los valores individuales de la distribución porcentual del I^* entre cada uno de los compuestos iodados del tiroides, obtenidos por cromatografía en papel, según la técnica descrita (Materiales y Métodos). La representación gráfica de la media \pm d.s. aparece en la figura nº 1. Hemos representado por separado la media de las glándulas de los pacientes nº 8 y 9 por razones que se exponen más adelante. Los valores correspondientes obtenidos en glándulas humanas normales se dan en la Tabla nº 3; estos los hemos tomado de las publicaciones de Ermans y Cols. (1968, a, b) juntamente con los obtenidos por los mismos autores en 16 BMN eutiroideos, la representación gráfica de estos valores medios \pm d.s. se hace en la figura nº 2.

Como puede apreciarse por una comparación somera de la Tabla nº 2 y la Tabla nº 3 y de las Figuras nº 1 y 2, el patrón de distribución porcentual del iodo entre los iodoaminoácidos obtenidos en todos los grupos de glándulas que hemos estudiado, es diferente al obtenido por los citados autores en glándulas normales. No creemos que esto se deba a que en el presente caso se trate de la distribución porcentual del I^* y en los de Ermans y Cols. (1968, a, b) la distribución porcentual de I^{127} , por los motivos que se discutirán más adelante. En nuestros BMN eumetabólicos, además de una distribución porcentual de MIT * y DIT * alterada, destaca una notable disminución en la proporción del I^* incorporado que se encuentra en las iodotironinas marcadas (T_4^* y T_3^*). en la Figura nº 1 hemos representado separadamente los valores per-

T A B L A N º 3

Distribución porcentual del I^{127} entre los diversos compuestos iodados del tiroides correspondiente a las glándulas humanas normales descritas por Ermans y Cols. (1968, a, b). El compuesto que ellos denominan X_2 lo interpretamos como el equivalente a nuestro origen.

Glándula normal N º	X_2	I^-	MIT	DIT	T_4	T_3
66	10.2	19.8	29.0	33.5	13.9	2.2
67	6.7	18.9	30.2	35.5	15.2	4.0
68	10.1	10.1	36.3	29.8	-	-
98	8.0	17.1	28.8	29.3	25.7	3.8
140	6.7	18.9	30.2	35.5	14.8	5.1
148	7.9	20.2	33.6	24.1	6.8	15.2
195	8.0	17.1	28.8	29.3	-	-
199	8.5	18.0	30.3	36.0	15.8	17.7
201	12.3	5.1	27.9	38.1	20.1	5.4

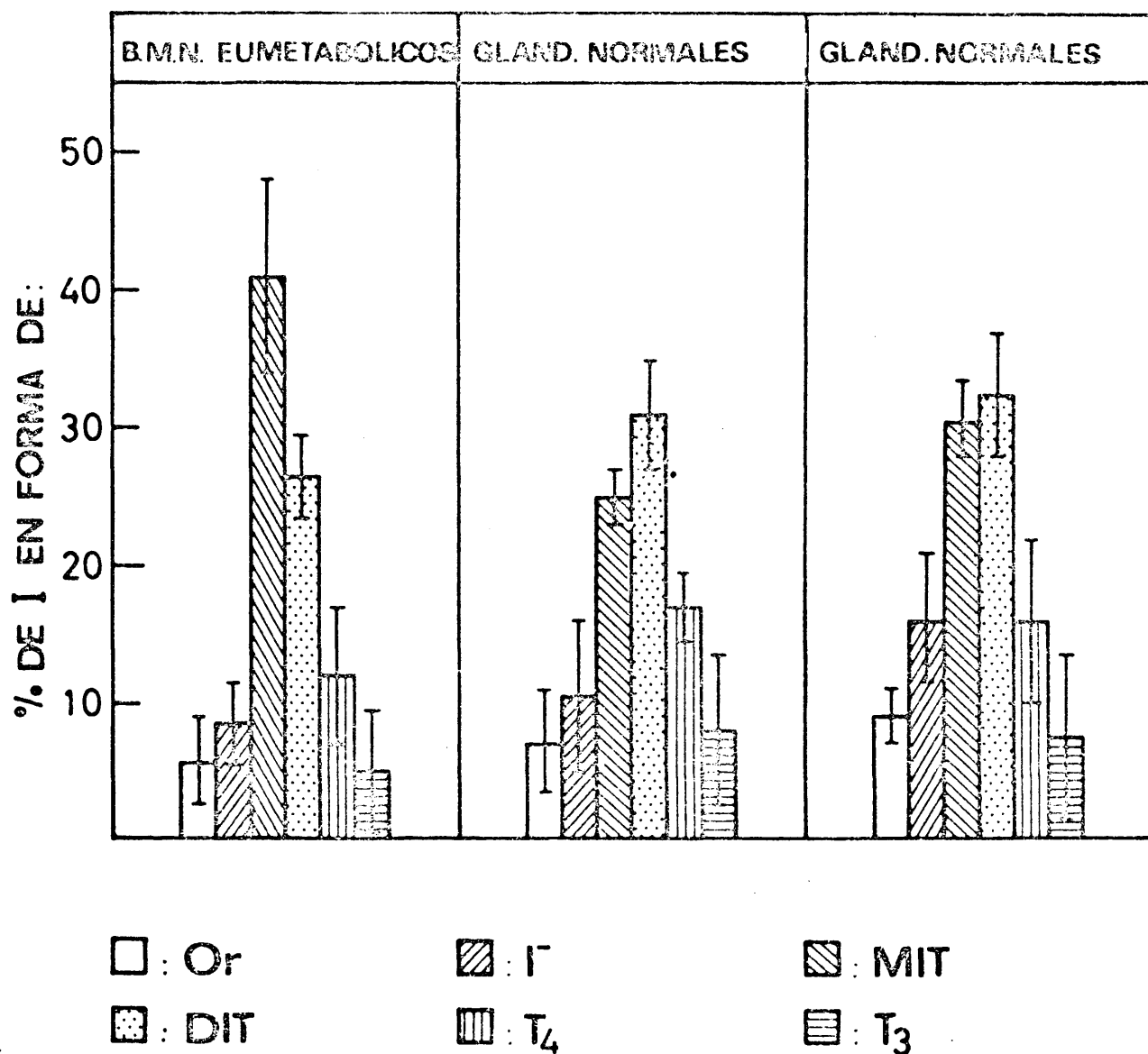


Figura nº 2.

Representación gráfica de la distribución del I^{127} entre los iodo-aminoácidos de las glándulas normales estudiadas por Ermans y Cols. (1968, a, b), así como la de los 16 BMN-eumetabólicos estudiados por los mismos autores. Los valores individuales se dan en la Tabla nº 3.

tenecientes a las glándulas nº 8 y 9 (carcinomas papilares, Ca. T.) porque en ellas se aprecia que la distribución porcentual del I^* incorporado a las iodotironinas, es algo superior al incorporado en los BMN eumetabólicos, aunque la distribución del I^* incorporado a las iodotirosinas es similar; como se indica en el pie de la Figura, al tratarse únicamente de dos glándulas, no hemos podido aplicar cálculo estadístico a los resultados y por ello no aparecen representadas las d.s. correspondientes. En los B. hipermetabólicos tampoco se encuentran unas proporciones de cada iodo compuesto marcado iguales a las de las glándulas normales, puesto que la proporción que aparece como MIT * es mayor en estas últimas (con respecto a los B. hipometabólicos nº 13 y 14, ver el apartado C del presente capítulo).

Parecen vislumbrarse unos cambios graduales y sistemáticos de la distribución del iodo entre los compuestos iodados del tiroides al ir de los BMN a los B. hipermetabólicos, pasando por las glándulas normales descritas por Ermans y cols. (1968, a, b). En los BMN se observa una proporción muy superior de MIT * sobre la de DIT * y una proporción baja de iodotironinas. En las glándulas de los enfermos hipermetabólicos la proporción de MIT * es muy inferior a la de DIT * y la proporción de iodotironinas es la más alta de las encontradas en este estudio. Los BMN estudiados por Ermans y Cols. dan un patrón intermedio entre las del presente estudio y el de las glándulas normales.

En la Tabla nº 4 se expresan algunos cocientes y otras relaciones entre los diversos iodoaminoácidos marcados expuestos en la Tabla nº 2 y que corresponde a las glándulas

T A B L A N º 4

Algunos cocientes y otras relaciones entre los diversos iodoaminoácidos marcados expuestos en la Tabla n º 2, correspondientes a datos obtenidos en las glándulas humanas estudiadas en la presente Tesis.

Paciente N º	$\frac{MIT^{\Delta}}{DIT^{\Delta}}$	$\frac{DIT^{\Delta}}{MIT^{\Delta} \downarrow DIT^{\Delta}}$	$\frac{T_3^{\Delta}}{T_4^{\Delta}}$	$\frac{T_4^*}{2DIT^*}$	$\frac{T_3^*}{(MIT^* \downarrow DIT^*)}$
1	0,81	0,55	0,05	0,092	0,0048
2	3,49	0,22	0,21	0,047	0,0044
3	3,53	0,22	0,26	0,11	0,0139
4	3,27	0,23	0,09	0,061	0,0024
5	1,51	0,39	0,05	0,047	0,0023
6	1,45	0,40	0,23	0,039	0,0078
7	2,97	0,25	0,27	0,095	0,0133
8	3,19	0,23	0,39	0,248	0,046
9	1,60	0,38	0,39	0,134	0,040
10	0,69	0,58	0,15	0,299	0,054
11	0,69	0,58	0,18	0,371	0,080
12	0,60	0,62	0,25	0,171	0,054
13	-	-	-	-	-
14	0,36	0,73	-	0,021	-

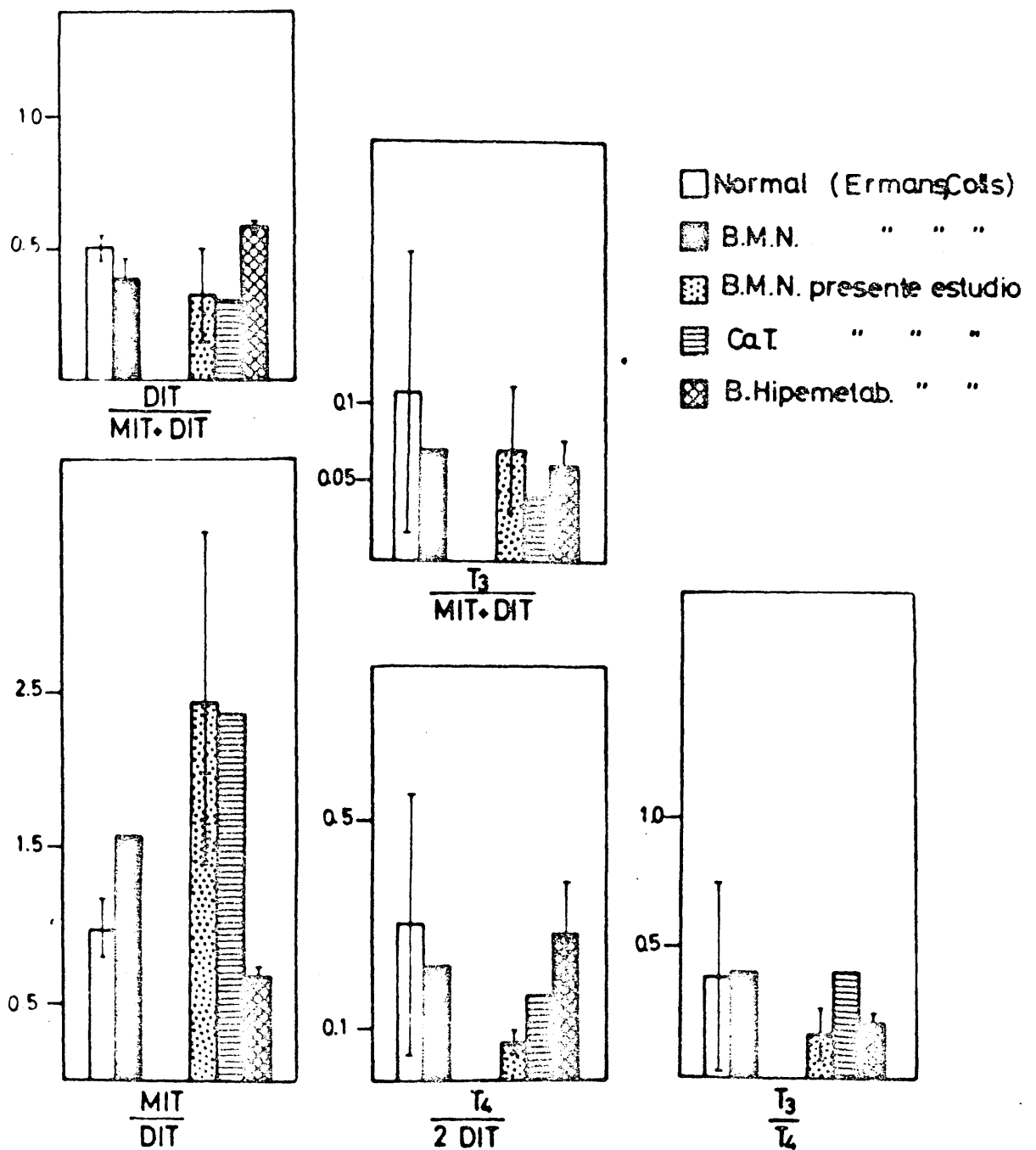


Figura nº 3.

Representación gráfica de algunos cocientes y otras relaciones expresados en las Tablas nº 4 y nº 5 obtenidos de nuestros datos y de los de Ermans y Cols. (1968, a, b). "Índices de acoplamiento" para T_4 y T_3 corresponden a $T_4 / 2 DIT$ y $T_3 / MIT + DIT$, respectivamente.

estudiadas por nosotros. En la Tabla nº 5 se detallan los mismos parámetros, pero calculados a partir de los datos de la Tabla nº 3, obtenidos por Ermans y Cols. (1968, a, b). En la Figura nº 3 representamos conjuntamente los valores medios \pm d.s. En esta Figura podemos apreciar los siguientes puntos:

1º.- Los cocientes MIT^*/DIT^* , expresión de la distribución relativa del I^* entre las iodotirosinas, se encuentran significativamente elevados en los BMN y los Ca. T. con respecto a los valores hallados en las glándulas normales y en los B. hipermetabólicos.

2º.- La eficiencia con que el I^* se incorpora a la DIT^* expresada por el cociente $\frac{DIT^*}{(MIT^* + DIT^*)}$ es menor en los BMN y Ca. T. que en las glándulas normales y en éstas a su vez menor que en los B. hipermetabólicos.

3º.- No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de la distribución relativa del I^* entre las iodotironinas expresado por la relación $\frac{T_3^*}{T_4^*}$. El que la d. s. de los datos de las glándulas normales sea tan amplia, se debe a que, como se ve en la Tabla nº 3, los valores porcentuales de la T_3 , tienen una gran variabilidad cuantitativa (desde 2,2 % a 17,7 %) que no se da en nuestros resultados (véase Tabla nº 2). Esta diferencia es atribuible a que en nuestro sistema cromatográfico, la separación de la banda correspondiente a la T_3^* es más constante que en el sistema de análisis usado por Ermans y Cols. (1968, a, b).

4º.- "Índices de acoplamiento" para T_4^* y T_3^* . Estos son los expresados por los cocientes $\frac{T_4^*}{2 DIT^*}$ y $\frac{T_3^*}{(MIT^* + DIT^*)}$ respectivamente. Su definición aparece en el pie de la Tabla nº 4. Estos índices se derivan de la posible relación precursor producto se-

T A B L A N º 5

Algunos cocientes y otras relaciones entre los diversos iodoaminoácidos expuestos en la Tabla nº 3 correspondientes a las glándulas humanas normales de mans y Cols. (1968, a, b).

Glándula normal nº	$\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$	$\frac{\text{DIT}}{\text{MIT} + \text{DIT}}$	$\frac{\text{T}_3}{\text{T}_4}$	$\frac{\text{T}_4}{2\text{DIT}}$	$\frac{\text{T}_4}{\text{MIT} + \text{DIT}}$
66	0,86	0,53	0,15	0,20	0,032
67	0,85	0,54	0,26	0,21	0,060
68	1,22	0,45	-	-	-
98	0,98	0,50	0,14	0,91	0,057
140	0,85	0,54	0,34	0,20	0,077
148	1,39	0,41	2,23	0,14	0,260
195	0,98	0,50	-	-	-
199	0,84	0,54	1,12	0,21	0,260
201	0,73	0,57	0,26	0,26	0,081

gún la cual $1 \text{ DIT}^* + 1 \text{ DIT}^* = 1 \text{ T}_4^*$ y $1 \text{ MIT}^* + 1 \text{ DIT}^* = 1 \text{ T}_3^*$.

El "índice de acoplamiento" para T_4^* se encuentra disminuido significativamente en los BMN con respecto al que se encuentra en los B. hipermetabólicos y glándulas normales; en estos últimos dos grupos los valores hallados son similares. En las glándulas de los pacientes con Ca. T. se encuentra un valor ligeramente superior con respecto al "índice de acoplamiento" encontrado en los pacientes con BMN, aunque sigue siendo inferior al de las glándulas normales y al de los B. hipermetabólicos.

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los valores medios del "índice de acoplamiento" para T_3^* , encontrado en los diferentes grupos de glándulas presentados aquí.

En la Tabla nº 6 se recogen los datos obtenidos por nosotros, referentes al peso de la glándula, I^* del tiroides precipitable con ác. Tricloroacético (o sea, en forma orgánica), la concentración de I^{127} de la glándula y el grado de iodación de la Tiroglobulina.

Los pesos de las glándulas se obtuvieron en el quirófano mismo, inmediatamente después de extraídas. En los pacientes nº 1 al 9 y en los nº 13 y 14 se practicaron tiroidectomías totales. En el paciente nº 10 se practicó una nodulectomía; en los pacientes nº 11 y 12 se hizo tiroidectomía subtotal, extirpando aproximadamente el 75 % de la glándula. En estos casos el dato numérico que aparece en la Tabla representa el peso de la

T A B L A N º 6

Paciente	Peso en gramos de la glándula	I [*] precipitable con Ac.T.C.A. %	I ¹²⁷ en glándula mg / 100 g	Pico A(T.G.) [*] Iodación % mg I/100 mg prot.
1	273	96,1	4,62	0,312
2	308	97,1	4,25	0,079
3	99	98,2	1,40	0,054
4	649	99,4	6,37	0,104
5	82	99,9	6,25	0,114
6	60	97,1	15,32	0,073
7	40	95,3	0,10	0,03
8	170	87,4	0,75	0,139
9	70	89,2	1,25	0,144
10	27	93,5	4,54	0,472
11	160	95,8	13,0	0,290
12	102	82,8	10,5	0,410
13	320	1	25,0	-
14	85	94,3	15,00	-

I^{*} precipitable con TCA %: expresa el % del trazador radioactivo que se detectó en el precipitado final, después de tres adiciones sucesivas de ác. tricloroacético seguidas de centrifugación y representa el porcentaje del trazador ligado a proteínas tiroideas.

El grado de iodación del tiroides se expresa por los mg. de I¹²⁷ contenidos en 100 g. de tejido fresco. El grado de iodación de la T.G. por los mg. de I¹²⁷ contenidos en 100 mg. de la proteína purificada.

pieza operatoria.

La determinación de la proporción del I^* de una alícuota de cada glándula que se precipitó con ác. Tricloroacético (véase Materiales y Métodos) indicó claramente que del 82 al 99 % del I^* , estaba incorporado a proteínas tiroideas en los casos 1 al 12 y en el N^o 14. En la glándula del paciente n^o 13, la radioactividad recuperada en el precipitado final fue menor del 1% de la inicial, siendo esto una prueba más del defecto existente en dicha glándula (ver apartado C del presente capítulo).

Los valores correspondientes a "iodación", tanto de tejido tiroideo fresco como de T.G., corresponden a todo estable o I^{127} , haciéndose la determinación por duplicado al menos, de cada una de las muestras.

Las concentraciones de I^{127} , en tejido fresco, de todos los pacientes estudiados por nosotros, se encuentran por debajo de los límites inferiores dados por Ermans y Cols. (1968, a, b) para glándulas normales, en las que se encuentran unos valores de $62 \pm 19,8$ (mg. de I^{127} por 100 g. de tejido). Merece destacarse en los datos de las glándulas de los pacientes con BMN la amplia variabilidad de los valores encontrados que, como se ve, oscila entre 1,4 y 15,3 mg. de I^{127} por 100 g. de tejido fresco. Esto mismo observan también los citados autores, en glándulas de pacientes con la misma enfermedad, habiendo encontrado variaciones aun más amplias (entre 0,8 y 41,4 mg. de I^{127} por 100 g. de tejido fresco).

La iodación porcentual de la T.G. purificada, de las glándulas de los pacientes con BMN da un valor medio de $0,095 \pm$

$\pm 0,058$. Ermans y Cols. (1968, a, b) dan como cifras de iodación porcentual de la T.G. purificada de glándulas normales un valor medio de $0,23 \pm 0,15$ d.s. y en T.G. purificada de BMN encuentran valores bajos similares a los nuestros ($0,06 \pm 0,035$ d.s.).

Las glándulas de los pacientes con Ca. T. (nº 8 y 9) dan valores que están en los límites inferiores de la normalidad (media de $0,14\%$).

En los B. hipermetabólicos del iodación porcentual de la T.G. purificada da un valor medio de $0,39 \pm 0,09$ d.s. que es el más alto de los valores encontrados por nosotros, siendo la diferencia estadísticamente significativa si lo comparamos con los valores de los BMN y Ca. T. y glándulas normales de Ermans y Cols. (1968, a, b), aunque el valor estadístico es relativo ya que el número de datos de los B. hipermetabólicos es tres.

En la glándula del paciente nº 13, las repetidas determinaciones de I^{127} efectuadas en la T.G. purificada dieron unos valores indetectables.

En la glándula del paciente nº 14 no pudo determinarse el grado de iodación de la T.G. por no haber T.G., estando el I^{127} incorporado a otras proteínas.

Como puede verse en la Tabla nº 6, no hay paralelismo entre concentraciones de I^{127} en tejido fresco y iodación porcentual de la T.G. purificada de la misma glándula. Incluso se encuentra que glándulas con menos I^{127} por unidad de tejido fresco, presentan una mayor iodación porcentual de la T.G.

una vez purificada, reflejándose en ello que puede haber mucha variabilidad en la cantidad de T.G. por unidad de tejido fresco. Esto es muy manifiesto, si comparamos, por ejemplo, dos glándulas de pacientes con diferente estado metabólico periférico: la glándula del paciente nº 11 (hipermetabólico) con menos I^{127} en tejido fresco que la del nº 6 (eumetabólico), presenta un buen grado de iodación de la T.G. (0,29 %), mientras que en el último ésta es notablemente baja (0,07 %).

En las Figuras 4 a 7 representamos gráficamente el por ciento de I^* incorporado a iodoaminoácidos, o algunas de las relaciones entre éstos, en función de la iodación porcentual de la T.G. purificada.

En la Figura nº 4 se representa el % de I^* como T_4^* en función de la iodación de la T. G. purificada de cada una de las glándulas estudiadas por nosotros, excluidos los pacientes nº 13 y 14. Puede observarse como el % de I^* incorporado a T_4^* , aumenta a medida que lo hace la iodación porcentual de la T.G. Aunque no haya datos suficientes para saber si se trata de una regresión lineal o no, si se calcula el índice de correlación lineal se encuentra que es estadísticamente significativo (usando datos individuales $r = + 0,86$ y $p < 0,001$).

En la Figura nº 5 hemos representado los valores correspondientes a "índice de acoplamiento" para T_4^* frente a iodación porcentual de la T.G. Puede observarse como la eficiencia de este acoplamiento aumenta en proporción directa al grado de iodación porcentual de la T.G., existiendo una correlación positiva, con las salvedades hechas anteriormente ($r = 0,67$ y $p < 0,02$).

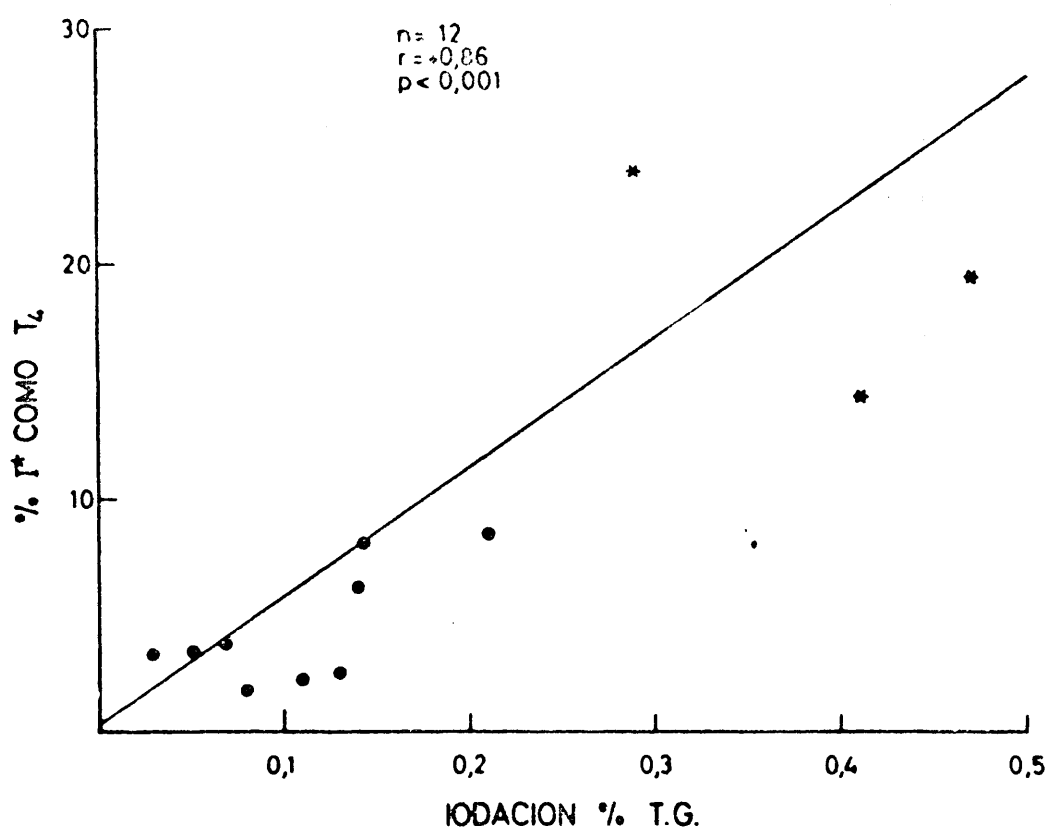


Figura nº 4.

% de I^* como T_4 representado en función del grado de iodación de la T.G. purificada, según datos obtenidos de las glándulas de nuestros pacientes. Los puntos en forma de estrella corresponden a los B. hipermetabólicos y los redondos a los BMN y Ca. T. Como se ve, el % de T_4^* es función del grado de iodación de la T.G.

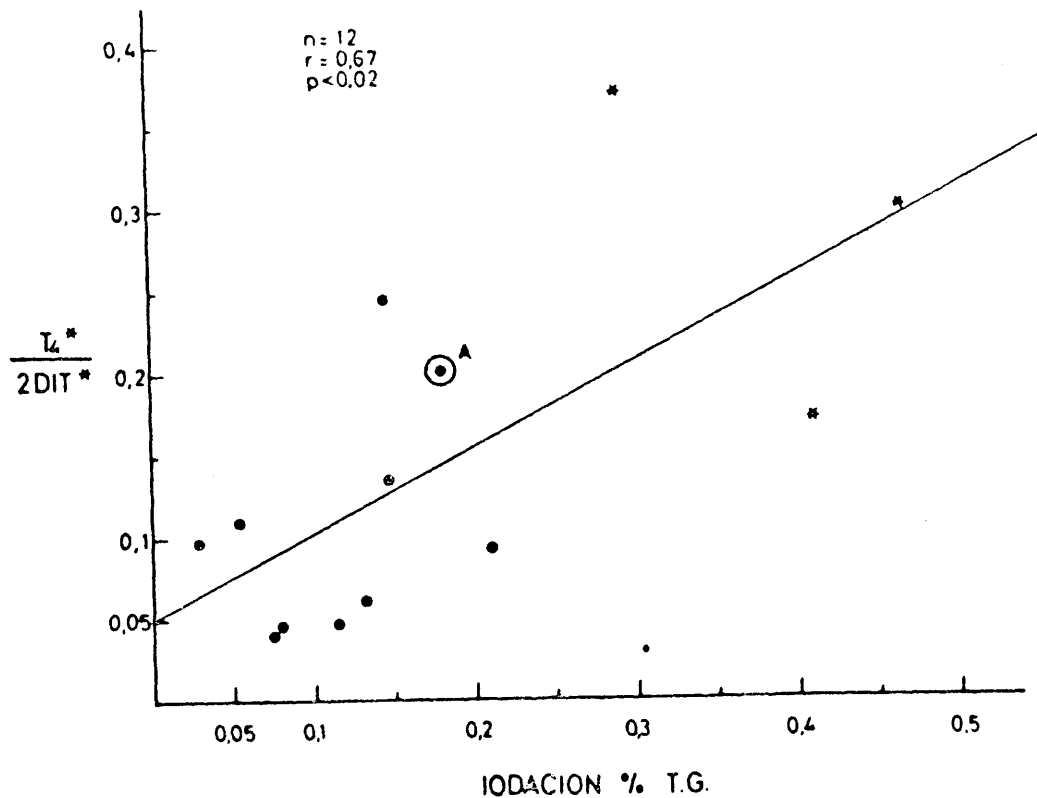


Figura nº 5.

Se representa el "índice de acoplamiento" para T_4^* en función del grado de iodación de la T.G. purificada, según los datos obtenidos de las glándulas de nuestros pacientes. El punto A representa el valor medio correspondiente a las glándulas normales de Ermans y Cols. (1968, a), las estrellas nuestros B. hipermetabólicos y los círculos a los BMN y Ca. T. Como se ve, el "índice de acoplamiento" para T_4^* es función del grado de iodación de la T.G.

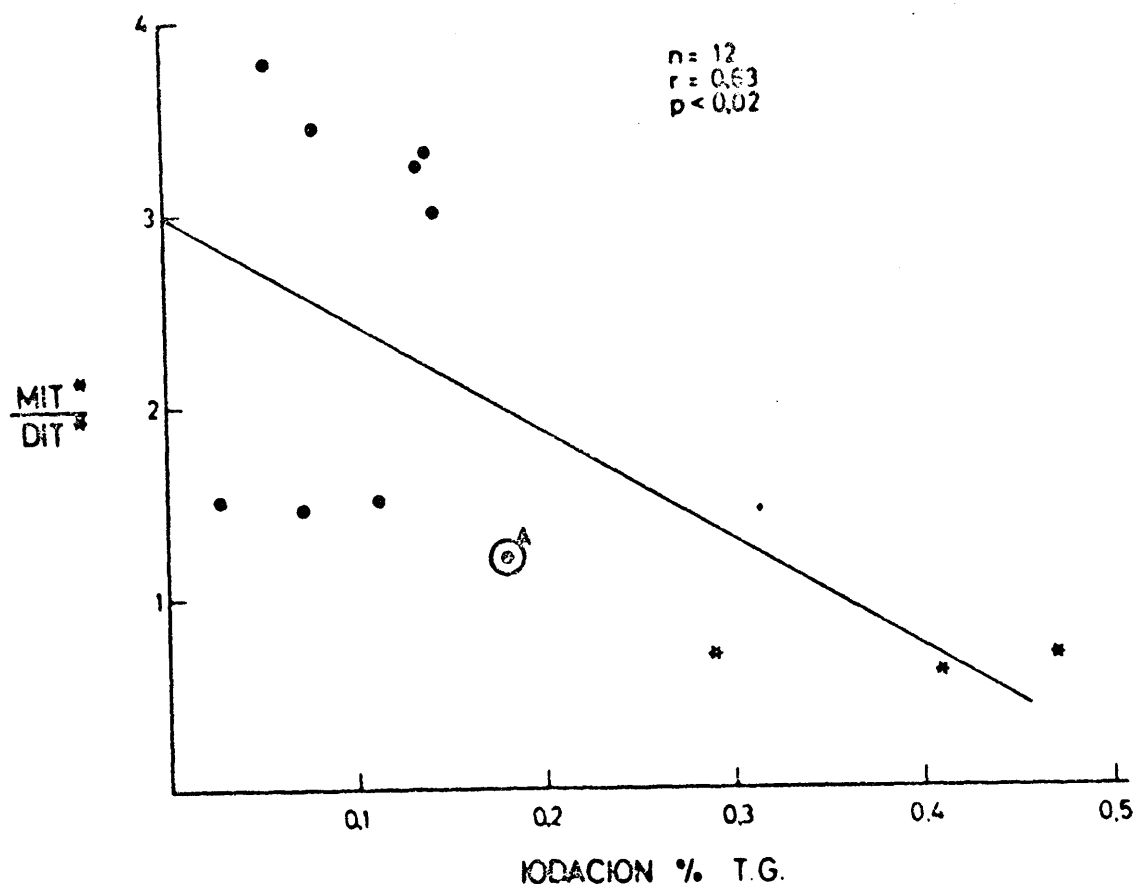


Figura nº 6.

Se representa el cociente $\text{MIT}^* / \text{DIT}^*$ frente a iodación porcentual de la T.G. según los datos obtenidos de las glándulas de nuestros pacientes. El punto A, las estrellas y los círculos representan lo mismo que en la Figura nº 5. Se observa como a medida que desciende el grado de iodación de la T.G. sube el cociente de esta relación, indicando que la distribución relativa del I^* a favor de la forma monoiodada*, aumenta inversamente al contenido en iodo de la T.G.

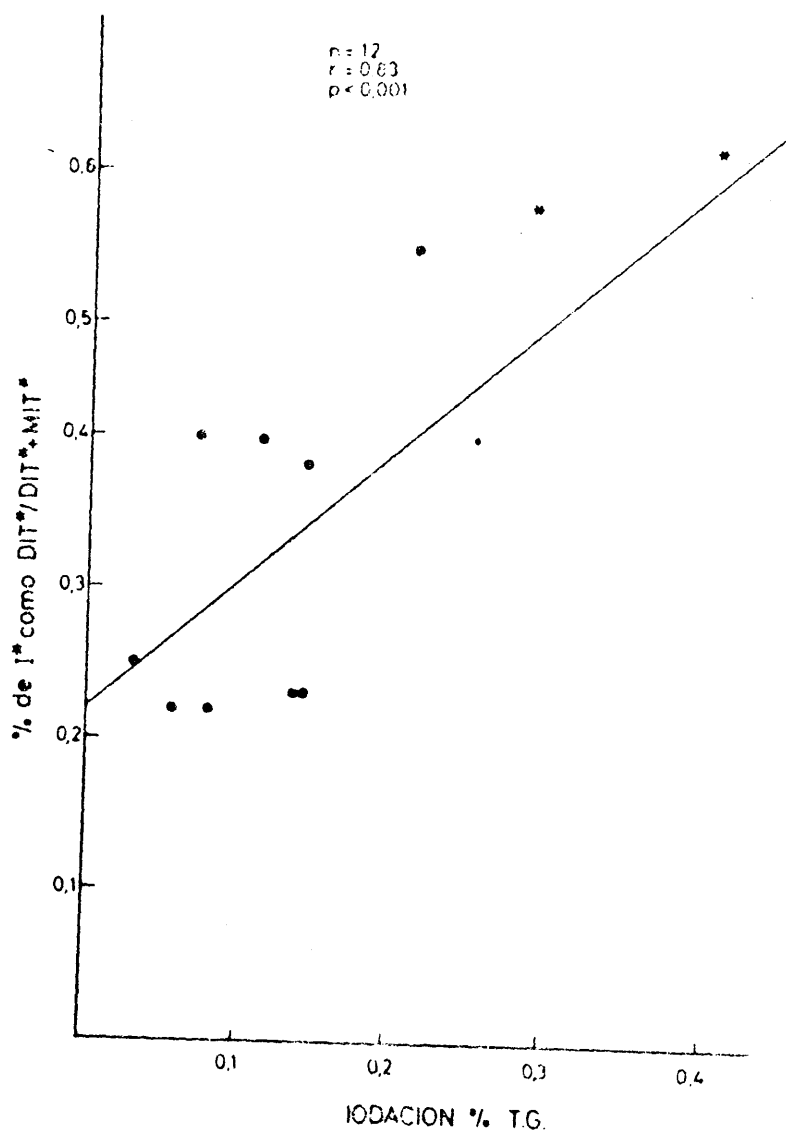


Figura nº 7.

Se representa la eficiencia con que el I^* se incorpora a la DIT^* , calculando ésta en función del total de iodotirosinas marcadas, frente a iodación % de la T.G. Se observa como la eficiencia en la formación de DIT^* va aumentando en relación directa a la iodación de la T.G.

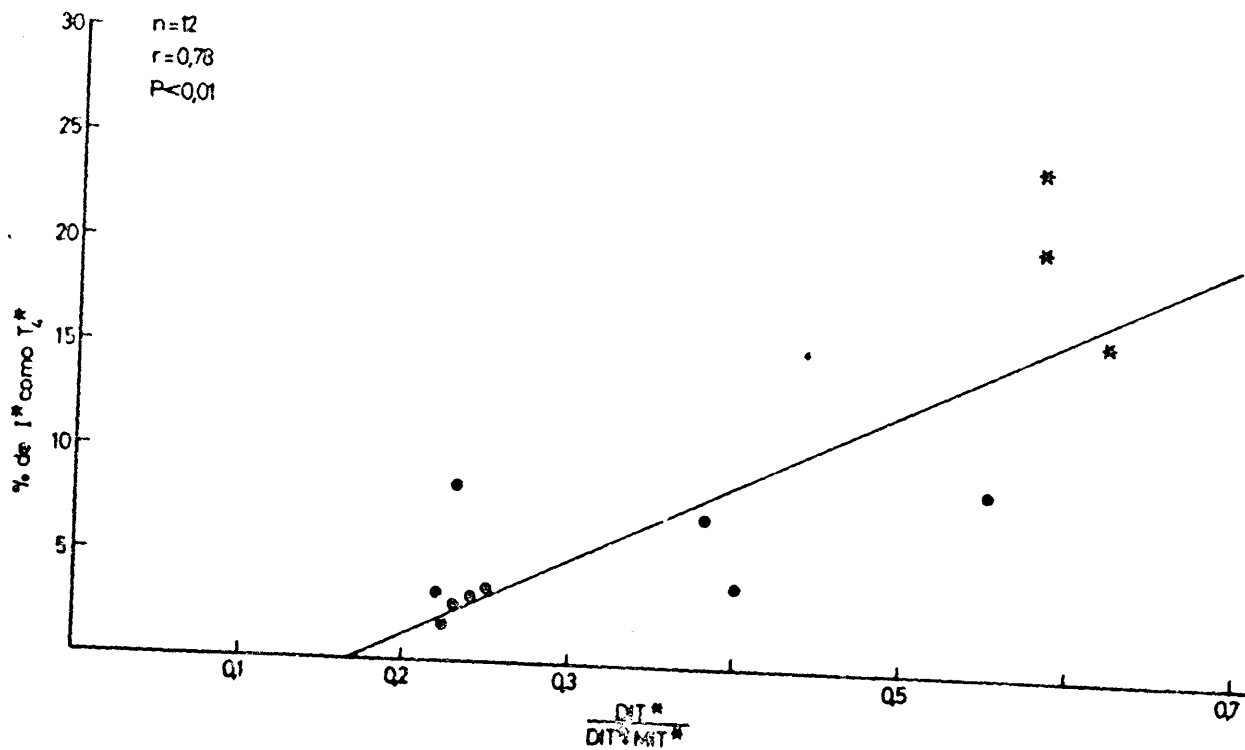


Figura nº 8.

Representación gráfica de la proporción de T_4^* que se llega a formar en función de la proporción de DIT^* , calculando ésta en función del total del I^* incorporado a las iodotirosinas. Se deduce de aquí que la eficiencia del "acoplamiento" para T_4^* , sería nula a partir de una determinada disminución de la proporción de DIT^* en el total de las iodotirosinas marcadas.

pacientes con BMN eumetabólicos, con respecto a la indicada para glándulas normales por Ermans y Cols. (1968, a, b) y a los B. hipermetabólicos del presente estudio. Hay una disminución ostensible entre este dato en las glándulas n^o 8 y 9 (Ca. T. eumentabólicos) y el de los grupos normales e hipermetabólicos, arriba indicados.

2^o.- La proporción de I^* incorporado a las iodotironinas es similar en las glándulas normales y en los B. hipermetabólicos.

3^o.- Hay alteraciones, estadísticamente significativas, en las proporciones del I^* incorporado a las iodotirosinas en las glándulas de los pacientes con BMN eumetabólico, si se comparan con las glándulas normales y los B. hipermetabólicos. La más característica de estas alteraciones es un valor aumentado en la relación MIT^*/DIT^* . Un aumento semejante puede observarse en las glándulas de los pacientes con Ca. T. (n^o 8 y 9).

4^o.- La iodación porcentual de la T.G. está notablemente disminuida en las glándulas de los pacientes con BMN eumentabólico, aunque la glándula del paciente n^o 1 presenta una iodación normal de la T.G. En la glándula procedente del paciente n^o 13 la iodación porcentual de la T.G. es nula y en la del paciente n^o 14 no se puede valorar la iodación de la T.G. por encontrarse el I^* incorporado a otras proteínas, diferentes, no habiendo T.G.

5^o.- Las concentraciones de I^{127} determinadas en tejido tiroideo fresco y expresadas por unidad de peso del mismo, halladas

en todas las glándulas anormales estudiadas aquí, son bajas, en comparación con los valores hallados por Ermans y Cols. (1968, a, b) para glándulas humanas normales.

6º.- De las Figuras nº 4 a 7 se deduce reiteradamente que la distribución porcentual del I^* incorporado a las iodotirosinas marcadas y a la Tiroxina marcada depende directamente de la iodación porcentual de la Tiroglobulina.

Además de la Figura nº 8 se deduce una relación precursor-producto, estadísticamente significativa, entre DIT^* y T_4^* .

7º.- No hemos encontrado correlación entre los valores de I^* incorporado proporcionalmente a los iodoaminoácidos marcados y la concentración de I^{127} en tejido fresco. Además en las glándulas que hemos estudiado no vemos una relación entre la concentración de I^{127} en tejido fresco y la iodación porcentual de la T.G. purificada. De tal forma no se puede predecir con alguna exactitud la iodación porcentual correspondiente a la T.G. purificada de una glándula determinada a partir de la concentración de I^{127} en el tejido fresco.

8º.- Por último, en ninguna de las glándulas humanas estudiadas, se ve un aumento del I^* incorporado a la T_3^* , tomando como término de comparación los valores que se dan como normales en diversas publicaciones de otros autores para tiroides humanos.

FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-200 DE LAS PROTEINAS
SOLUBLES DE UN EXTRACTO SALINO DE TIROIDES NORMAL HUMANO

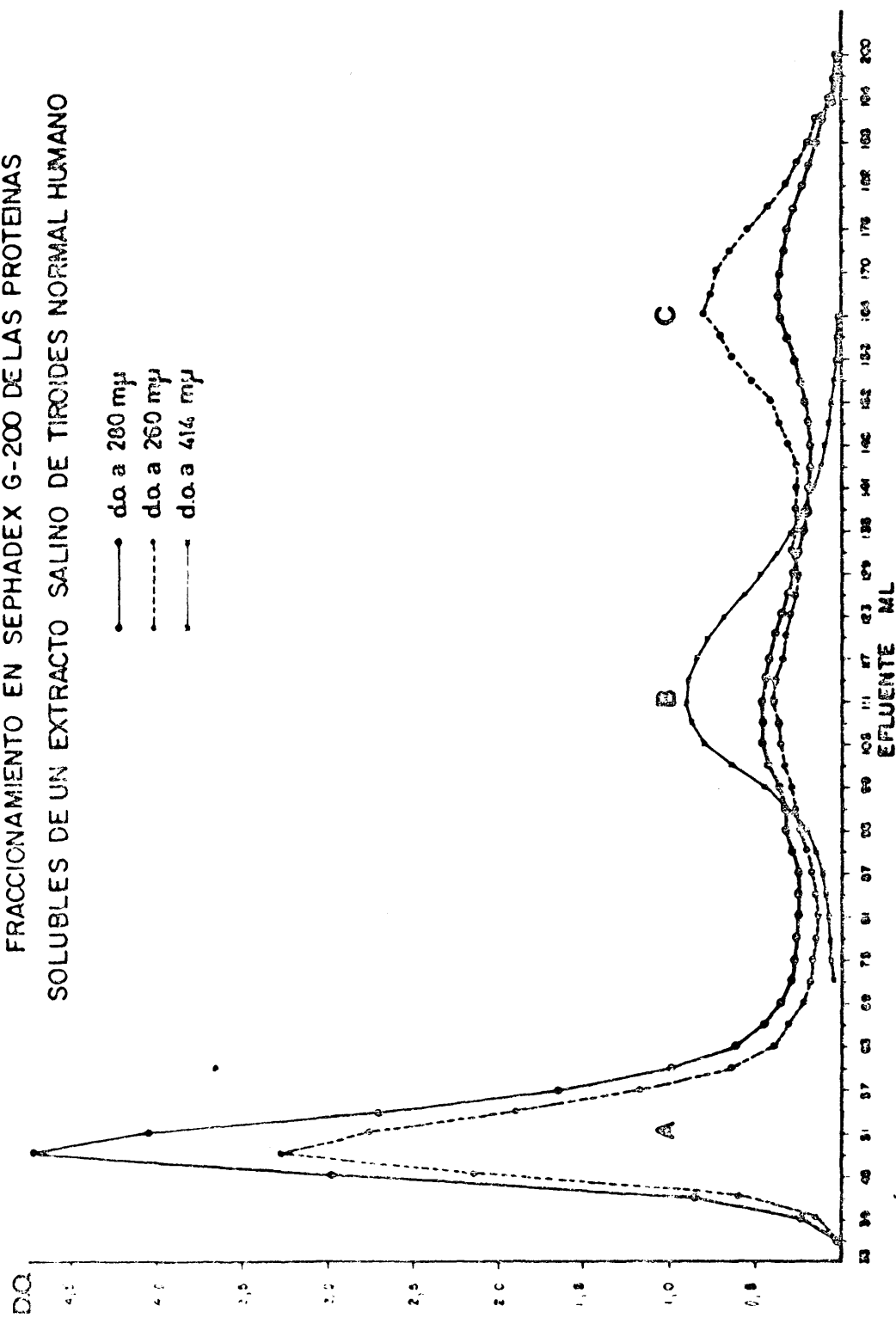


Figura nº 9.

FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-100 DE LAS PROTEINAS
SOLUBLES DEL E.S. DE UN B.MN. EUTIROIDEO

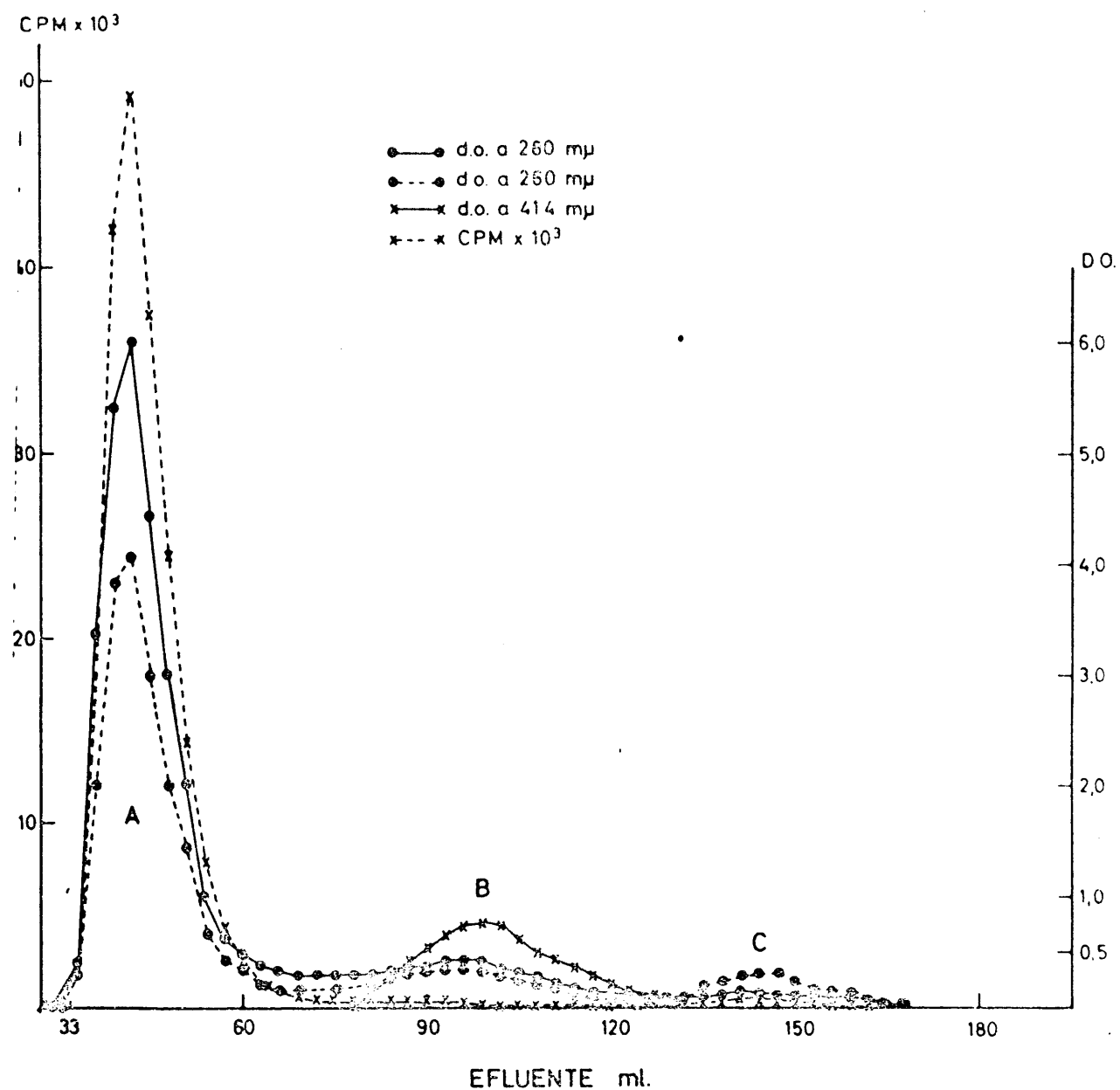


Figura nº 10.

FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-200 DE LAS PROTEINAS SOLUBLES DE UN E.S. DE CARCINOMA PAPILAR.

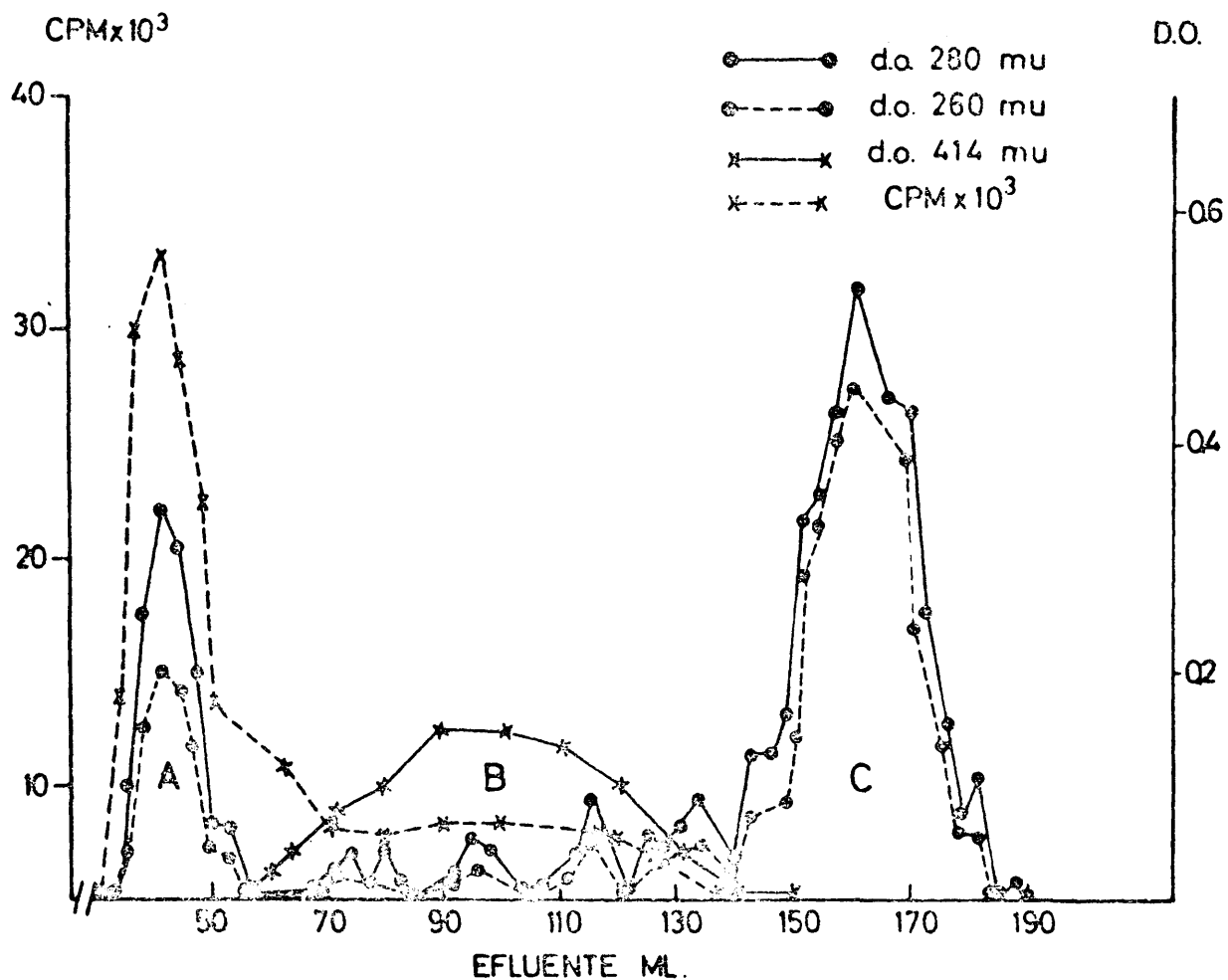


Figura nº 11.

rece un tercer pico, que denominamos Pico C, que tiene la característica de que la D.O. a 260 m μ (correspondiente a los ácidos nucleicos) es superior a la D.O. a 280 m μ (que corresponde a proteínas). La recuperación de proteínas en cada pico, fue la siguiente: en el pico A el 74 %, en el pico B el 14 % y en el pico C el 10 %, de las proteínas pasadas por la columna. La identificación de cada uno de estos tres picos se realizó sobre la base de los criterios indicados en Materiales y Métodos.

En la Figura nº 10 exponemos el patrón obtenido en uno de los 7 BMN eutiroides estudiados, como representativo de los obtenidos en los 6 restantes, que fueron esencialmente iguales a éste. Como se ve dicho patrón es muy similar al obtenido usando la glándula normal, tanto cualitativa como cuantitativamente.

En la Figura nº 11 vemos el patrón del fraccionamiento proteico obtenido del E.S., obtenido en idénticas condiciones que los anteriores, correspondiente a una Ca.T. Puede apreciarse que el Pico A, correspondiente a T.G., aparece en una proporción notablemente inferior (25 %) a la obtenida en los casos anteriores, mientras que el Pico C, aparece una proporción mayoritaria (60 %). El patrón obtenido usando el E.S. del otro Ca. T. fue similar a éste, y a los hallados por otros varios autores, tanto en carcinomas de tiroides humanos como en carcinomas experimentales en ratones.

Las Figuras nº 12 y nº 13 corresponden a los pa-

FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-200 DE LAS PROTEINAS SOLUBLES
DE UN E S DE UNA GLANDULA CON NODULO AUTONOMO HIPERFUNCION.

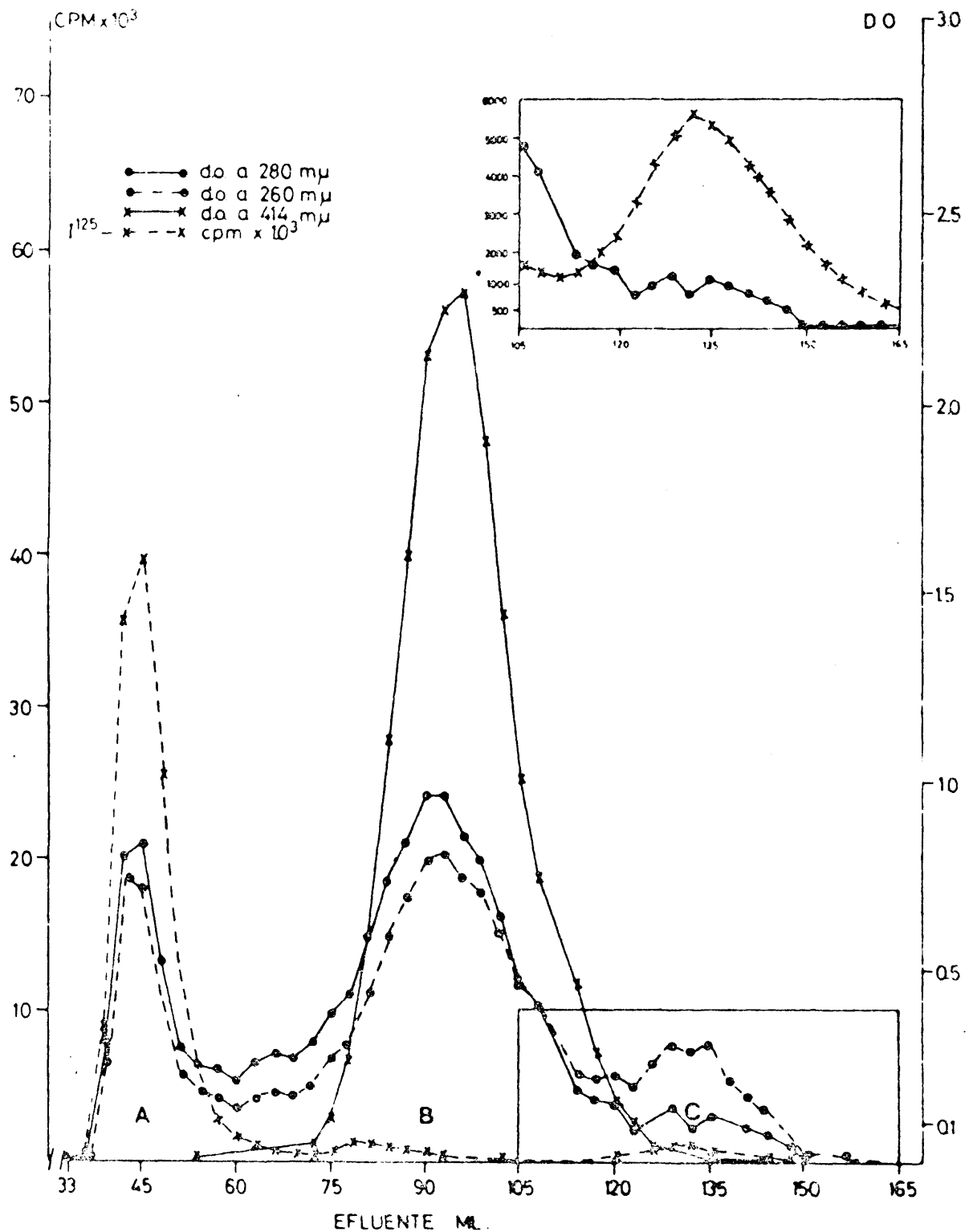


Figura nº 12.

FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-200 DE LAS PROTEINAS SOLUBLES DE UN E.S. DE UNA GLANDULA DE ENF. DE GRAVES-BASEDOW.

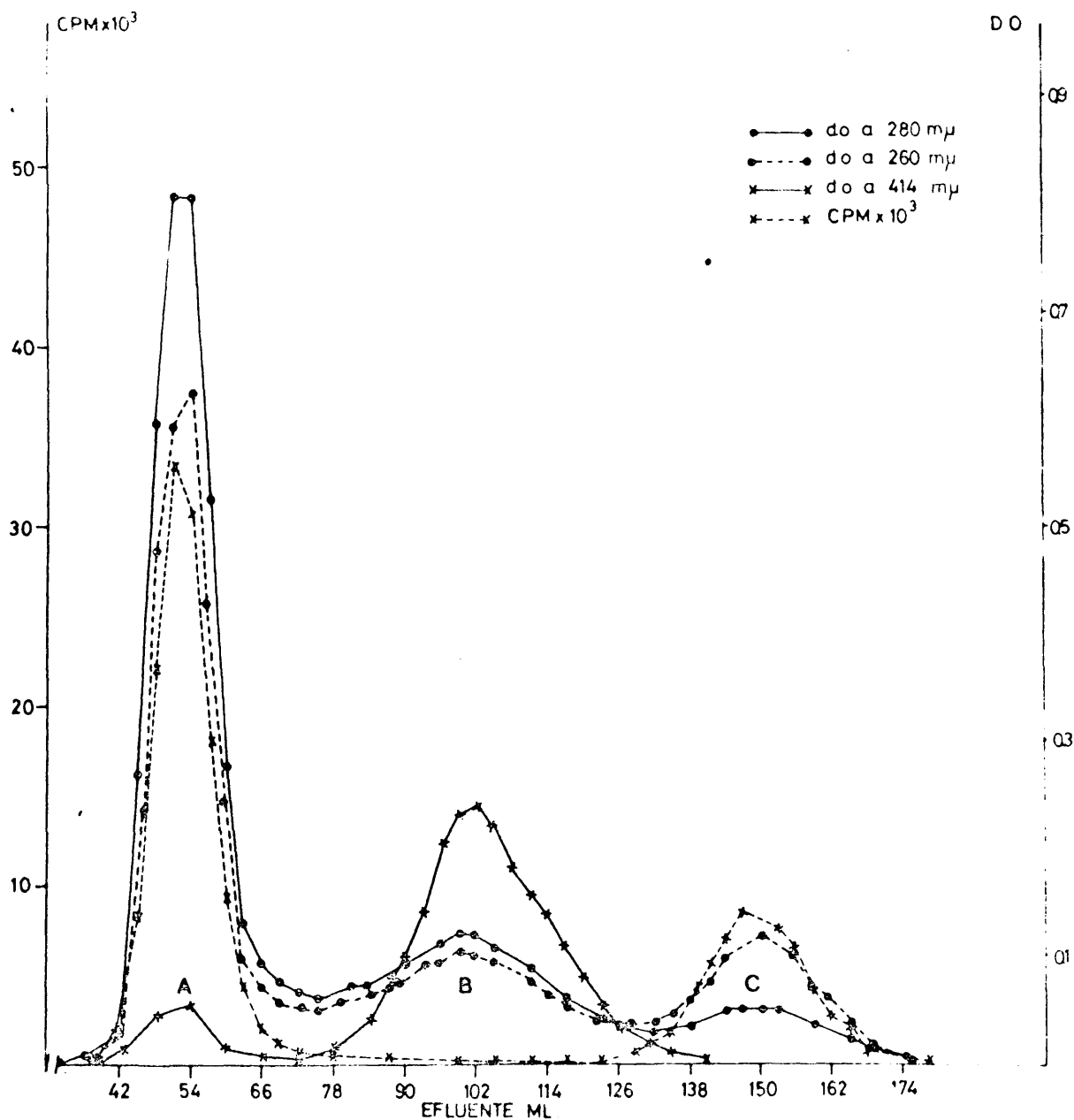


Figura n^o 13.

trones obtenidos en las glándulas con Nódulo autónomo hiperfuncionante y enfermedad de Graves-Basedow, respectivamente. En la Figura nº 12, puede apreciarse cómo la proporción del Pico B, correspondiente a H.b, se encuentra aumentada. Esto está de acuerdo con la hiperemia de este tipo de glándulas. A este aumento se debe que la T.G. represente una proporción menor de las proteínas totales que en el caso de la glándula normal y BMN eumetabólicos. La proporción, en cambio, del Pico C, es normal si se la compara con ellas. En la Figura nº 13, se representa el patrón obtenido usando el E.S. de la glándula de un enfermo afecto de Graves-Basedow. Al igual que en la glándula nº 12, apreciamos en este patrón que la proporción del Pico B, correspondiente a Hb, es ligeramente superior (25 %) a la de las glándulas normales y BMN eumetabólicos. Esto indica, como en el caso anterior, un aumento del contenido sanguíneo de esta glándula, expresión del aumentado volumen sanguíneo por minuto debido a la gran vascularización tiroidea, hechos típicos y conocidos de estas enfermedades.

b) Estudio inmunológico de los picos proteicos aislados en Sephadex G-200.

Como se indica en Materiales y Métodos, hemos utilizado corrientemente la técnica de doble difusión en gel de agar en placas de Ouchterlony.

Únicamente hemos estudiado el comportamiento inmunológico de las proteínas del Pico A o T.G. Se ha estudiado

en todas las glándulas descritas, desde la de los pacientes nº 1 al 13. En todas ellas las proteínas del Pico A han formado arco de precipitación frente a antisuero obtenido en conejos contra T.G. humana normal. Esto indica que hay una identidad inmunológica entre las proteínas del Pico A de todos estos pacientes y la T.G. humana normal.

En lo referente a la glándula del paciente nº 14, se han hecho algunos estudios inmunológicos más amplios, que se detallan en el apartado C de este capítulo dedicado a ella.

c) Resultados de los análisis en ultracentrífuga analítica (U.A.).

En la Figura nº 14 se muestra el patrón obtenido en U.A. usando un extracto salino de la glándula normal, obtenido según la técnica de Schlierem, ya descrita en Materiales y Métodos. La concentración proteica a que se trabajó fue de 10 mg. de proteína por ml de buffer. La fotografía está tomada en el minuto 15 después de poner la máquina a un régimen de 56.000 r.p.m. La progresión de las bandas es de derecha a izquierda, mirando frontalmente al plano del papel. Se observan tres bandas: una más rápida, en una proporción del 7 %, otra más lenta y mayoritaria, en proporción del 80 % y otra aun más lenta, cuya proporción es del 11 %. Al medir las respectivas constantes de sedimentación resultó que la más rápida es una proteína 27 S, la segunda es 19 S y la tercera, más lenta, es 4 S.

La Figura nº 15, tomada en idénticas condiciones de tiempo, concentración y r.p.m. que la anterior, muestra el

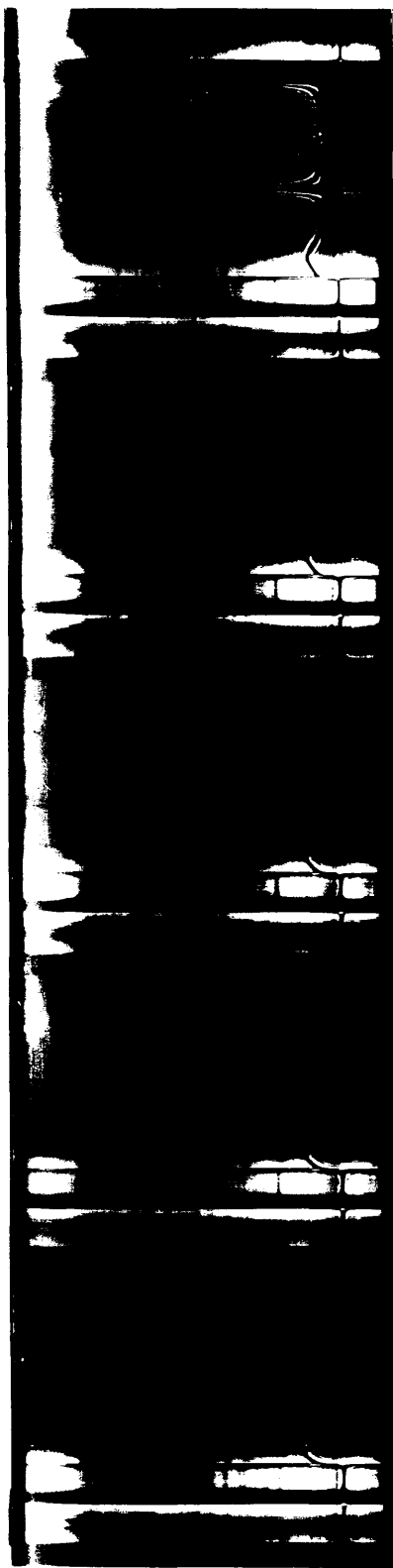


Figura nº 14.

Separación en U.A. de un E.S. de un tiroides normal. Las fotografías están tomadas a intervalos de tiempo regulares a un régimen de 56.000 rpm y concentración proteica 10 mg / ml. Se observan tres bandas principales con C.S. de 27 S, 19 S y 4 S, respectivamente.

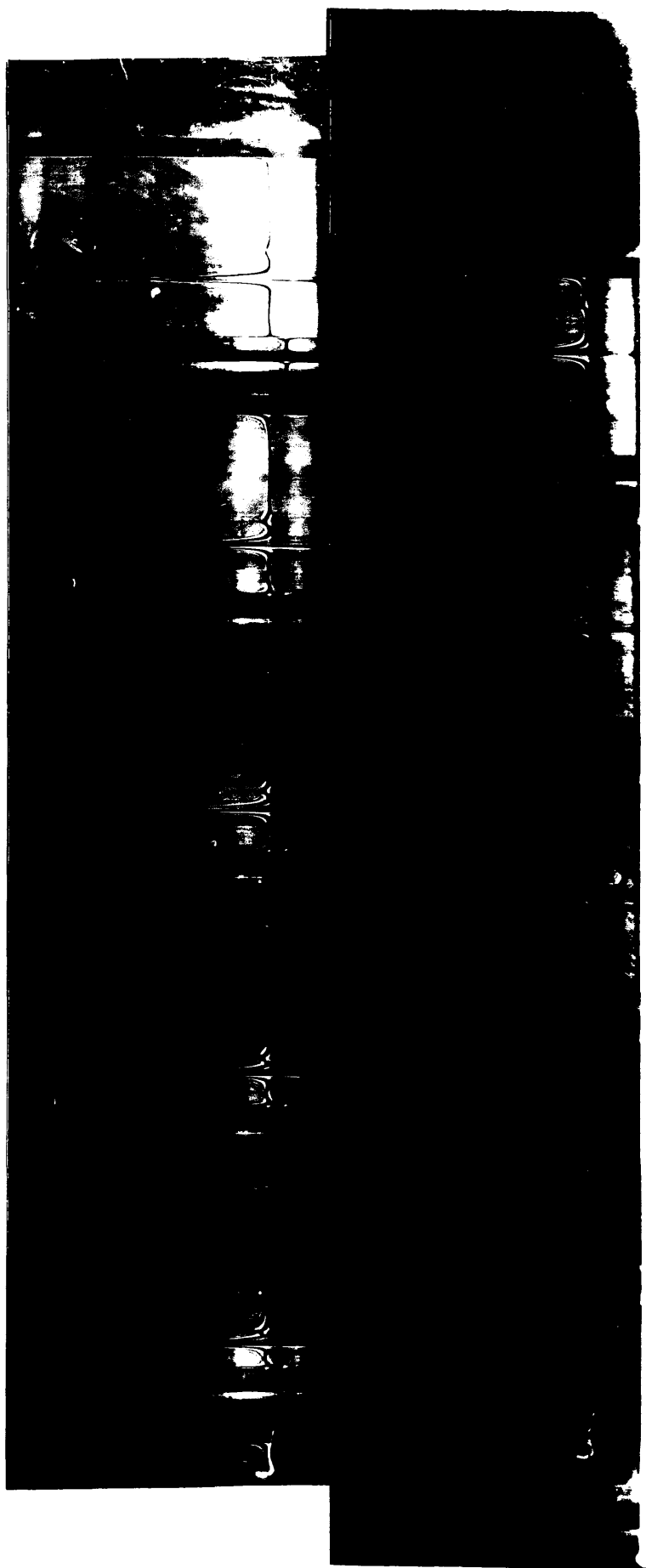


Figura nº 15.

Separación en U.A. de los componentes del pico A obtenido por purificación del E.S. de la glándula del paciente n.º 1 en Sephadex G-200. Las proteínas de este pico A tenían un grado de iodación del 0,213 %. Las condiciones experimentales son iguales que para la Figura anterior. Se observan dos bandas: la más rápida y minoritaria tiene un C.S. de 27 S y la más lenta y mayoritaria un C.S. de 19 S.

espectro obtenido cuando se corrió en la U.A. el Pico A, obtenido por purificación en Sephadex G-200 de la glándula nº 1 (correspondiente a un BMN eutiroideo). Esta T.G. purificada tiene una iodación igual al 0,213 %. Como ya indicamos en Materiales y Métodos y en otras ocasiones, el Sephadex G-200, es incapaz de separar las T.G. 19 S y 27 S, encontrándose una mezcla de las mismas en la rama ascendente de la curva y 19 S pura en la rama descendiente de la misma. Como se ve en la Figura nº 5 únicamente aparecen dos bandas, correspondientes a las proteínas 27 S y 19 S. Está ausente la 4 S, ya que en este caso hemos tomado un "pool" del Pico A después del fraccionamiento en Sephadex G-200, y la 4 S aparecería en el Pico C. La 27 S constituye el 12 % de las proteínas totales y la 19 S el 86 % de ellas.

La Figura nº 16 corresponde a un "pool" obtenido del Pico A del fraccionamiento en Sephadex G-200 de la glándula nº 6 (BMN eutiroideo) con iodación muy baja (0,073 %). Las condiciones de concentración proteica, tiempo y r.p.m. son idénticas que en la Figura nº 14. En esta glándula puede apreciarse una ausencia del componente 27 S. De la misma forma las glándulas nº 2 y 7, con iodación de la T.G. inferior al 0,1 %, muestran un espectro similar con ausencia del polímero 27 S.

La Figura nº 17 corresponde al espectro obtenido cuando se corrió en la U.A. un "pool" del Pico A de la glándula nº 8 (carcinoma tiroideo). La concentración proteica es de 6 mg de proteína por ml de buffer, y la fotografía está to-

Figura nº 16.

Separación en U.A. de las proteínas del pico A obtenido por purificación en Sephadex G-200 del E.S. de la glándula del paciente nº 6. Estas proteínas tenían un grado de iodación del 0,073 %. Las condiciones experimentales son idénticas que en las Figuras anteriores. Se puede apreciar una ausencia absoluta del componente 27 S. Usando los picos A de las glándulas de los pacientes nº 2 y nº 7 se obtuvo este mismo patrón.

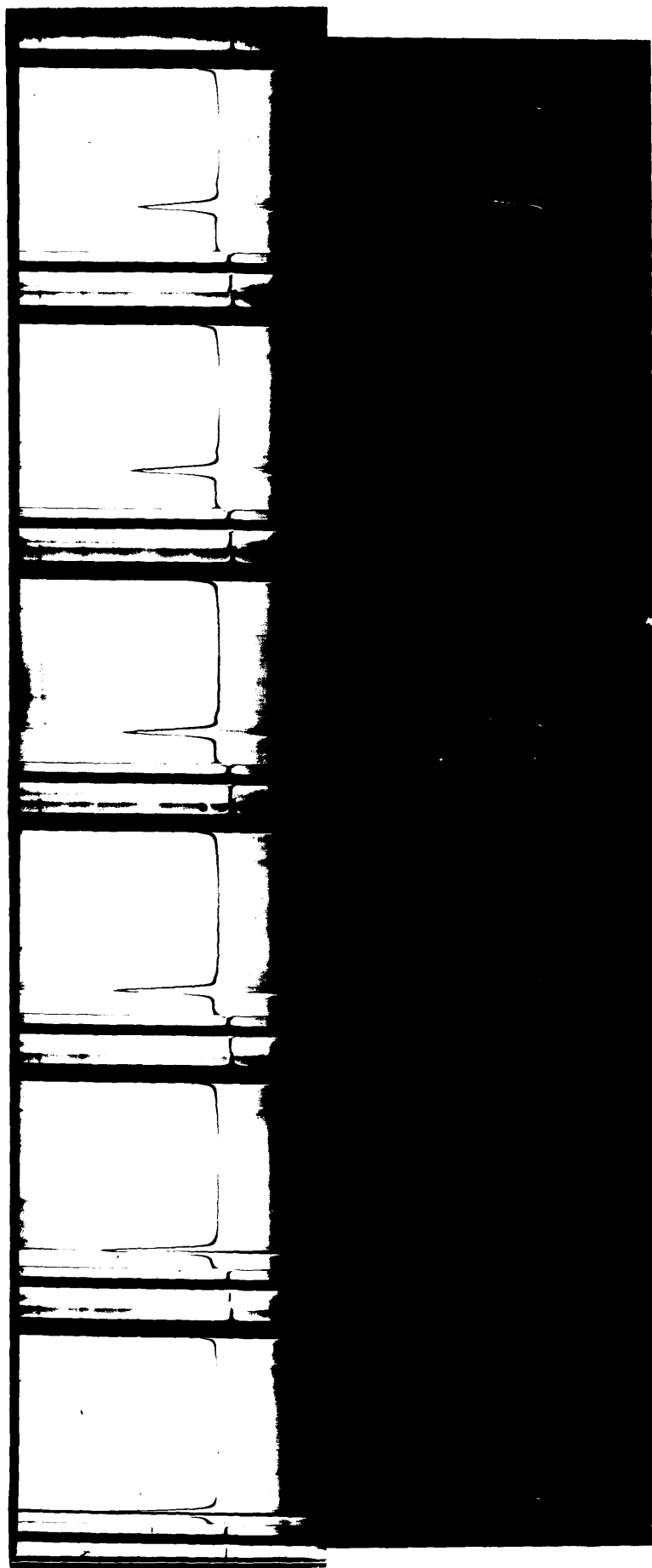


Figura nº 17.

Separación en U.A. de las proteínas del pico A obtenidas por purificación en Sephadex G-200 de la glándula del paciente nº 8. Estas proteínas tenían un grado de iodación de 0,144 %. Concentración proteica 6 mg / ml y 56.000 rpm. Se observa que hay componente 27 S, pero menor que en el caso de la Figura nº 15. Nótese que para la Figura nº 15 se usó un pico A con un grado de iodación más alto (0,213 %).

mada a los 15 minutos del régimen a 56.000 r.p.m., la progresión de las bandas es igual que en los otros casos, o sea, de derecha a izquierda. La iodación de una alícuota de dicho "pool" fue de 0,144 %. Puede observarse que, aunque en pequeña porporción (3,3 %) existe componente 27 S, estando el 96,1 % compuesto de 19 S.

d) Resumen.

Los resultados del estudio de las iodoproteínas solubles hasta aquí expuestos los podemos resumir en los siguientes puntos:

1º) Usando BMN eumetabólicos y B hipermetabólicos, se obtienen unas curvas de fraccionamiento en Sephadex G-200 similares a la obtenida en la glándula normal humana. El que en los B hipermetabólicos haya una proporción superior de Hb., que en la glándula normal, no quiere decir que la cantidad absoluta de T.G. esté disminuida en dichos B hipermetabólicos, sino que es un índice del elevado contenido hemático de los mismos.

2º) En los carcinomas de tiroides se observa una elevada proporción del pico C, dato que concuerda con lo encontrado por otros autores, así como una disminución en el pico A ó T.G., usando las mismas condiciones experimentales que nosotros y otras diferentes.

En nuestros datos destaca la poca radioactividad ligada a esta proteína.

3º) La T.G. purificada de las glándulas con las diferentes si-

tuaciones patológicas aquí expuestas, presenta la misma movilidad en Sephadex G-200 que la correspondiente a T.G. purificada de la glándula normal humana. Asimismo, presentan el mismo comportamiento inmunológico, tanto entre si como comparándolos con la glándula humana normal. Las únicas diferencias encontradas hasta ahora radican en los distintos grados de iodación y en el porcentaje relativo de los tres componentes 27 S, 19 S y 4 S.

4º) Los espectros en U.A. de los picos A, procedentes de las glándulas con una iodación porcentual de las proteínas de dicho pico inferior al 0,10 %, aproximadamente, presentan una ausencia del polímero 27 S. Con una iodación del 0,14 %, aproximadamente, ya se encuentra una pequeña proporción de dicho componente.

5º) Comparando estos resultados con los ya descritos referentes a la distribución porcentual del I^* entre los iodoaminoácidos (Figuras nº 4 a 7) vemos que una iodación de la T.G. inferior al 0,1 % aproximadamente, es precisamente el valor crítico por debajo del cual se altera de forma drástica la eficiencia en la formación de T_4^* .

C - Bocios congénitos. -

1) Por falta de incorporación del yoduro a compuestos orgánicos tiroideos.

a) Historia y pruebas clínicas:

Enferma de 16 años, nacida de parto normal en un pequeño pueblo de la provincia de Toledo. Al nacer se le observó una masa en el cuello que fue aumentando de volumen paulatinamente. El desarrollo ponderal, la deambulaci3n y la dentici3n fueron retrasados. No asisti3n nunca a la escuela y articulaba mal las palabras. Nunca recibió tratamiento con hormonas tiroideas, ni ning3n otro. En el a3o 1968 fue diagnosticada de bocio y enviada al Hospital Clínic3 de Madrid (Servicio del Prof. Gilsanz), donde se le apreci3 un gran bocio, con severos sntomas de hipotiroidismo y acusado retraso mental. No haba consanguinidad entre los padres, pero como se ve en la Figura n3 18, dos miembros de la familia materna tienen bocio.

La audiometría fue normal. El colesterol sérico de 480 mg/100 l. El PBI¹²⁷ sérico de 0,8 µg/100 ml.

Como se aprecia en la Figura n3 19, la captaci3n de I¹³¹ por el tiroides dos horas despu3s de su administraci3n oral, fue del 53 % de la dosis. Una hora despu3s de la administraci3n endovenosa de 1 g. de SCN⁻K, el contenido de I¹³¹ del tiroides descendió al 2,9 % de la dosis. Esto significa que el 94,53 % del radioyodo del tiroides ha sido desalojado por el SCN⁻.

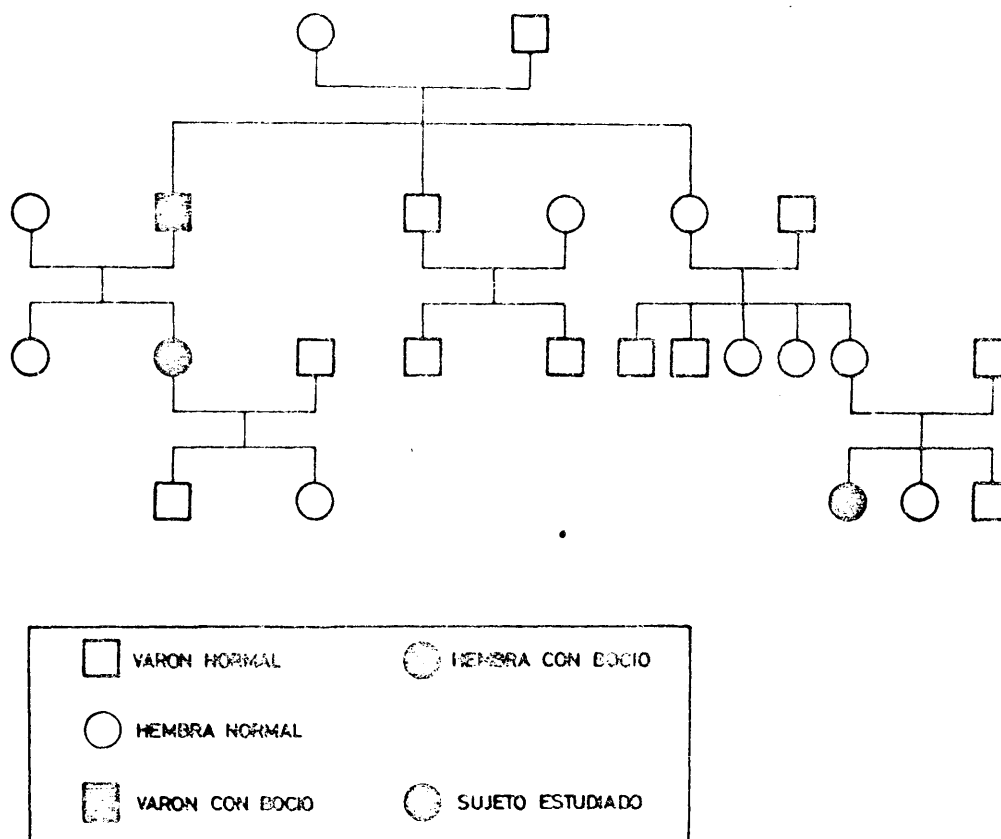


Figura nº 18.

Genealogía del paciente nº 13, que padece una incapacidad para incorporación del I^- a compuestos orgánicos del tiroides. No hay consanguinidad entre los padres, pero dos miembros de la familia materna padecen bocio.

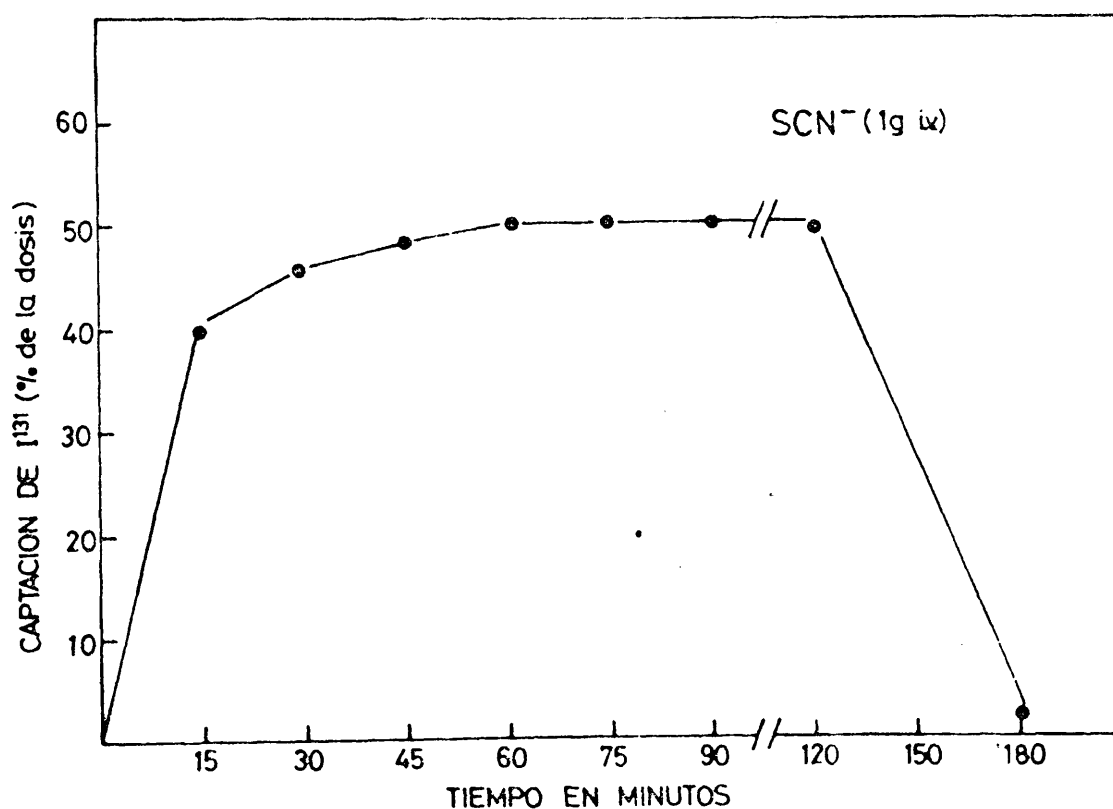


Figura nº 19.

Captación de I^{131} por el tiroides del paciente nº 13. Dos horas después de administrado el isótopo ($50 \mu C$), por vía oral, alcanzó un valor del 53 % de la dosis. Una hora después de la administración endovenosa de un gramo de $SCNK$, el contenido en I^{131} del tiroides descendió al 2,9 %.

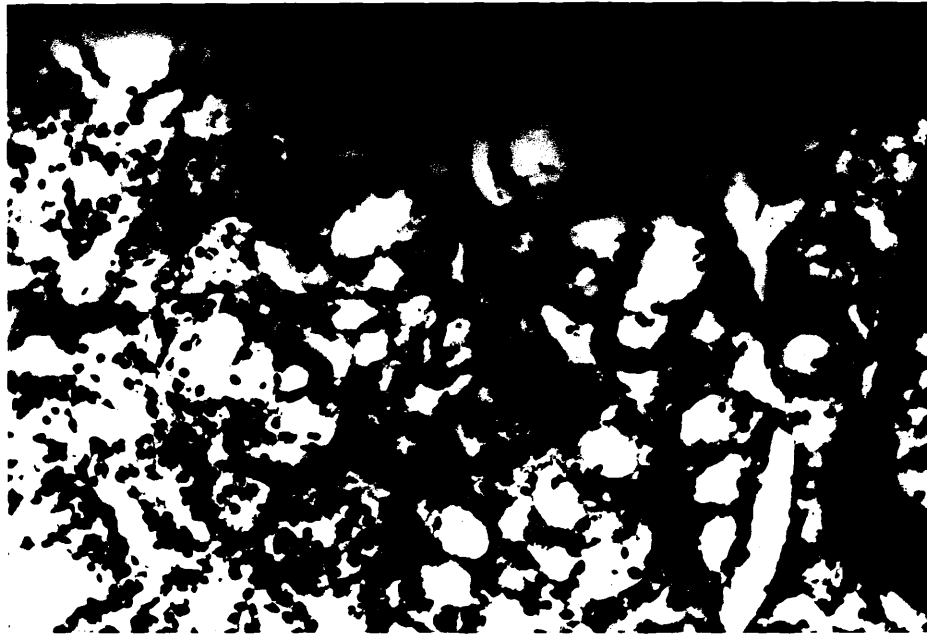


Figura nº 20.

Aspecto histológico de la glándula del paciente nº 13 vista al microscopio óptico. Se observa una gran hiperplasia parenquimatososa con escasos folículos, pequeños y sin contenido coloide aparente.

A causa de compresión traqueal debida al bocio, se le practicó una tiroidectomía total, administrándole 48 horas antes de la operación 150 μC del I^{131} . La glándula pesó 320 g.; no tenía aspecto nodular y presentaba al corte una coloración amarillenta con abundantes zonas focales hemorrágicas. Microscópicamente (Figura nº 20), se observó una gran hiperplasia parenquimatosa con escasos folículos, pequeños y sin contenido coloide aparente.

b) Métodos:

Se usó la misma metódica seguida en los 12 casos anteriores, descrita en el capítulo de Materiales y Métodos.

c) Resultados:

1) Distribución intratiroidea del I^{131} :

1 ml. del homogenado, contenía 5672 c.p.m. y 51 c.p.m. antes y después de la precipitación con ác. tricloroacético respectivamente. Como se ve, menos del 1 % del I^* se recuperó en el precipitado final.

En la cromatografía en papel de una alícuota del homogenado únicamente se detectó radioactividad en la banda correspondiente al I^{-*} , como se ve en la Figura nº 21.

Estos dos resultados demuestran que el iodo radioactivo no llega a incorporarse químicamente a un compuesto orgánico del tiroides y que muy probablemente, no pasa a un grado de oxidación superior al de I^- , requisito indispensable para la incorporación orgánica de este elemento. El contenido en I^{127} de la glándula fue de 25 mg/100 g. de tejido fresco.

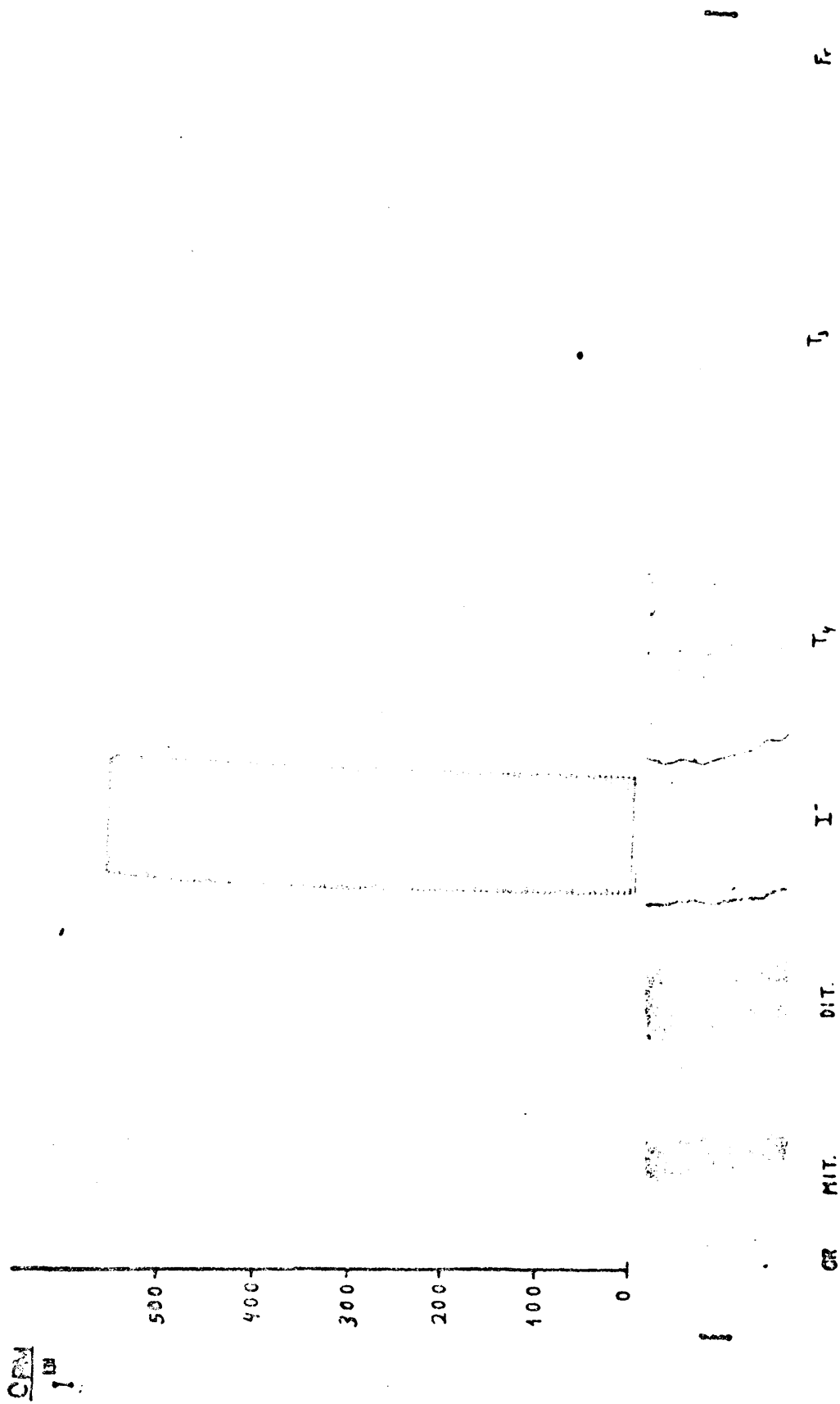


Figura n.º 21.

Cromatograma del hidrolizado glandular del paciente n.º 13. Obsérvese que toda la radioactividad aparece en la mancha correspondiente al I⁻. En la parte inferior aparecen teñidos los "transportadores" (carriers) de MIT, DIT, I⁻, T₄ y T₃ añadidos para identificar la localización del I⁻.

2) Fraccionamiento en Sephadex G-200 de las proteínas solubles del tiroides.

Como se ve en la Figura nº 22 aparecen tres picos, a los que como en casos anteriores denominamos A, B y C. El pico A aparece a partir de los 33 ml. y, como en casos anteriores, corresponde a la zona de la T.G. Comprendió el 16 % de las proteínas totales recuperadas. El pico B, correspondiente a la Hemoglobina (D.O. 414), contenía el 53 % de las proteínas recuperadas y el pico C comprendió el 31 %. Inesperadamente la radioactividad apareció superpuesta únicamente a este último pico. Sin embargo, tras 12 horas de dialisis contra ClNa 0,15 M, no se encontró radioactividad alguna asociada con la proteína del pico C. Esto quiere decir que el I^* no estaba ligado a esta proteína, sino que la radioactividad correspondía a I^- , que coincidió a su salida de la columna en el mismo volumen de elución del pico C.

Como se ve, la proporción relativa de las proteínas totales encontrada en el pico A es mucho menor que en la glándula normal, debido a las aumentadas proporciones de los otros dos picos. La mayor parte de las proteínas solubles era Hemoglobina, lo que coincide con la observación macrocópica de abundantes focos hemorrágicos intraglandulares. La proporción del pico C es algo más del doble de la que se encuentra en la glándula normal.

El pico A formó arco de precipitación frente a suero anti-T.G. normal humana obtenido en conejo y el pico B, puesto en gel de poliacrilamida con un patrón de Hemoglobina (Sigma) se comportó de la misma manera que ésta.

FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-200 DE LAS PROTEINAS SOLUBLES DE UN E.S. DEL
BICONCENTRO POR FALTA DE INCORPORACION DE I^{-} A COMPUESTOS ORGANICOS.

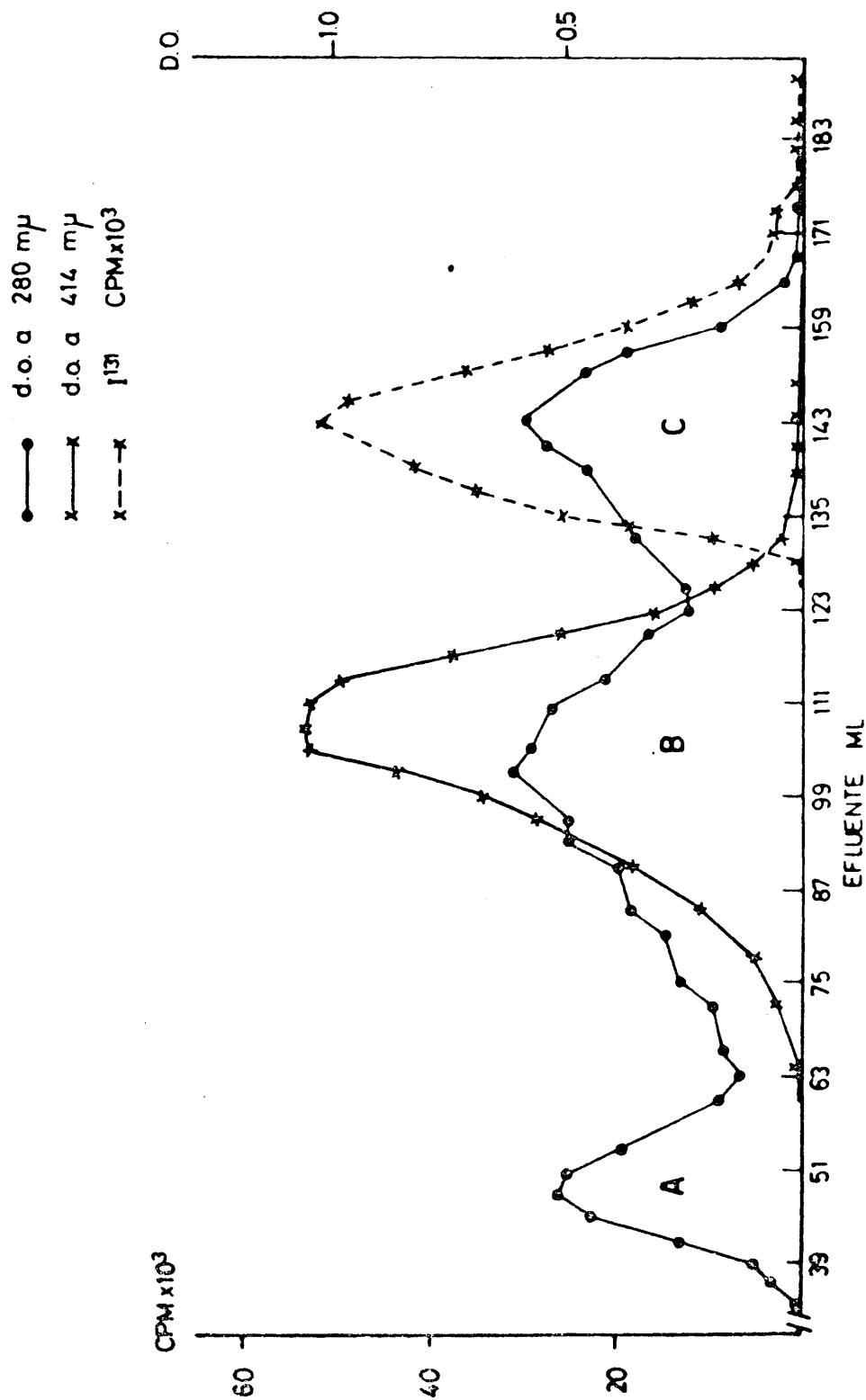


Figura n^o 22.

Las anomalías de este patrón se detallan en el texto.

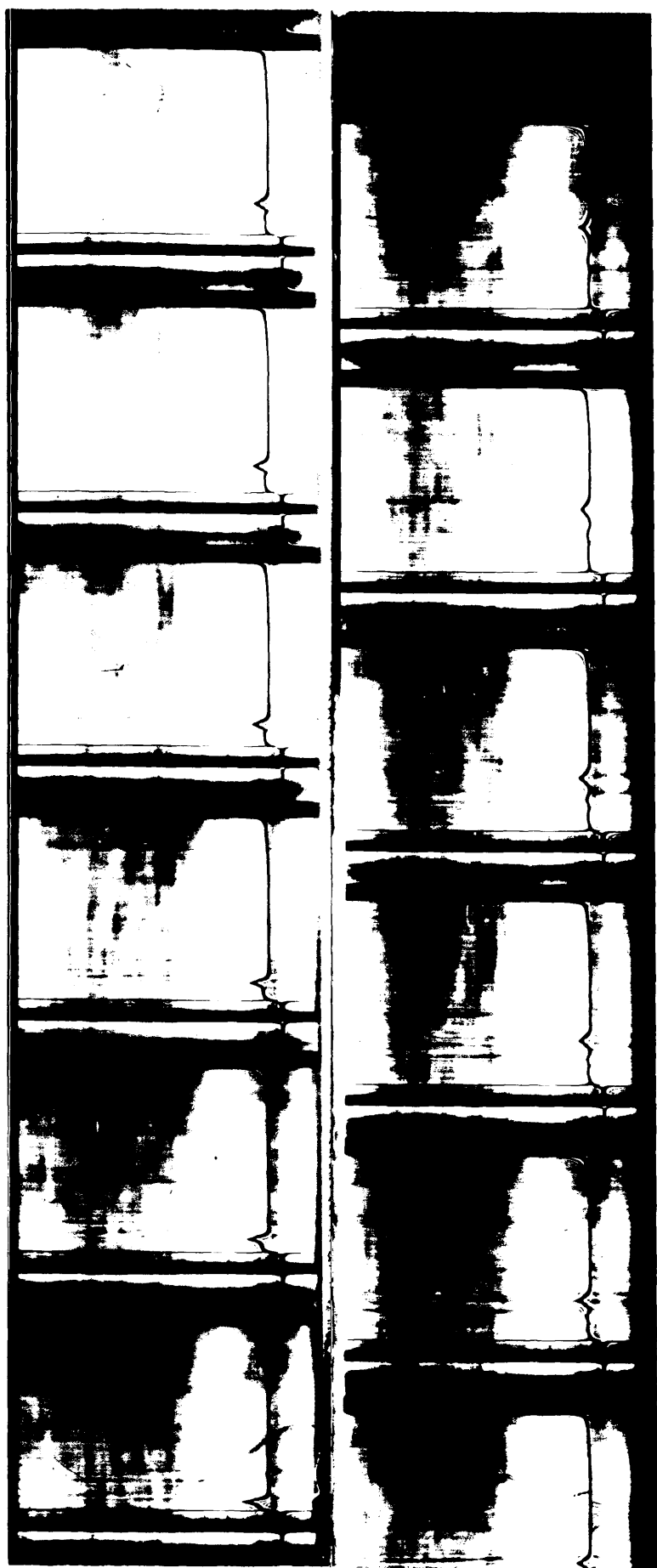


Figura nº 23.

Separación en U.A. de las proteínas del pico A obtenidas por purificación en Sephadex G-200 del E.S. de la glándula del paciente nº 13. Concentración proteica 2 mg / ml y 47.660 rpm. El C.S. del componente mayoritario fue recalculado a diferentes concentraciones proteicas y extrapolado a concentración 0. La $S_{w,20}^0$ fue igual a 17,5.



Figura nº 24.

Separación en U.A. de las proteínas del pico B, obtenidas por purificación en Sephadex G-200 del E.S. de la glándula del paciente nº 13. Concentración proteica 2,5 mg / ml y 59.000 rpm. El espectro está compuesto por una banda pigmentada con un C.S. de 3,98 S.

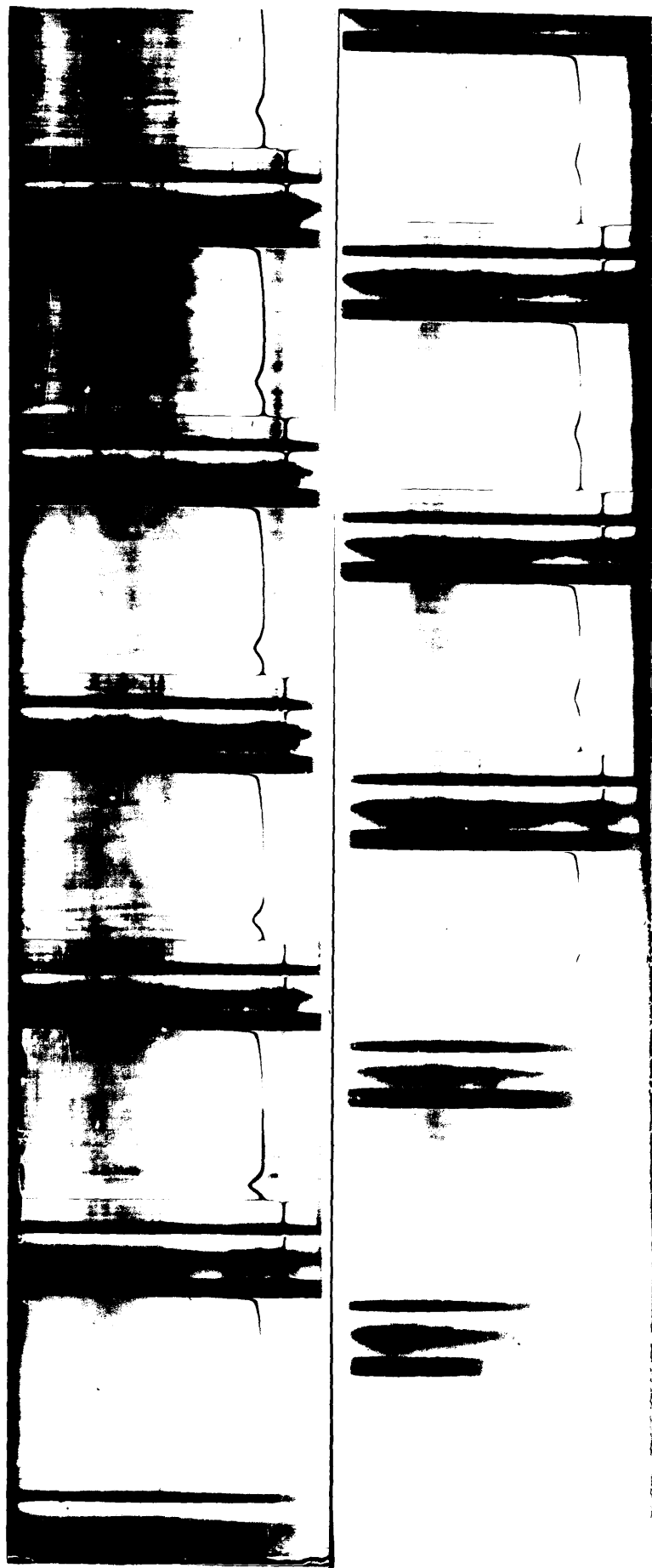


Figura nº 25.

Separación en U.A. de las proteínas del pico C, obtenidas por purificación en Sephadex G-200 del E.S. de la glándula del paciente nº 13. Concentración proteica 1,6 mg / ml y 59.780 rpm. El espectro se compone de una banda cuyo C.S., extrapolado a concentración 0, fue de 4,2 S.

3) Estudios en U.A. de las iodoproteínas solubles.

De cada uno de los picos obtenidos en Sephadex G-200 se hizo un estudio de su comportamiento en U.A.

Se vió que el pico A (Figura nº 23) está compuesto por una proteína predominante con un C.S. de 17 S y otros dos, en muy pequeña proporción, con un C.S. de 11,8 S y 3,9 S. El C.S. de la proteína mayoritaria se recalculó a diferentes concentraciones proteicas en ausencia de las otras dos proteínas contaminantes, y su C.S. real, extrapolado a concentración 0, fue de 17,5 S. Esta proteína se obtuvo pura tomando la parte ascendente del pico A. El régimen de velocidad con que se trabajó en este experimento fue de 47.660 r.p.m. a 20°C y la concentración proteica fue de 0,218 %.

Con el pico B (Figura nº 24) se encontró una sola proteína con un C.S. de 3,98 S y esta banda apareció pigmentada de naranja en la pantalla de la máquina.

El pico C (Figura nº 25) estaba compuesto también por una sola proteína con un C.S. de 4 S. Este también fue recalculado a diferentes concentraciones proteicas y su C.S. real extrapolado a concentraciones 0, fue de 4,2 S. Se trabajó aquí a 59.780 r.p.m. a 20°C y con una concentración proteica de 0,16 %.

d) Resumen.

Según la clasificación más aceptada de los bocios congénitos o dishormonogénéticos (Stanbury, 1966), las características de esta glándula corresponden al tipo llamado "Defecto de organificación" ya que el tiroides de estos enfermos es in-

capaz de transformar el I^- en forma organificada. Su carácter más definido y constante es que la captación del radioiodo por el tiroides es alta, rápida y con tendencia espontánea a descender bruscamente en las 24 horas siguientes. Si durante las primeras horas, cuando la captación tiroidea del isótopo es máxima, se les da ClO_4^- ó SCN^- , la caída es muy rápida a las dos horas de administrar estas drogas. Junto con esta cinética tan peculiar del radioiodo, se han definido otras características que son: bocio en la primera infancia, hipotiroidismo intenso, y frecuencia familiar del defecto. Exceptuando esto último, que no hemos podido documentar en el presente caso, todos los hallazgos presentes permiten clasificar a esta enferma en este grupo de "defectos de organificación".

De los datos procedentes del presente estudio podemos afirmar que la T.G.-nativa humana con una iodación del 0 %, tiene un C.S. de 17,5 S. Esta se comporta inmunológicamente igual que la 19 S humana iodada normalmente.

Como hemos visto en los experimentos de ultracentrifugación analítica del pico A, no se ha detectado ninguna forma de T.G. con C.S. mayor de 17,5 S. Es decir, hay una ausencia del componente 27 S.

Los otros dos componentes detectados en el pico A, tienen un C.S. de 11,8 S y 3,98 S. El componente 11,8 S no pudo ser recalculado a diferentes concentraciones proteicas, debido a la escasa proporción recuperada, pero podemos asumir que se trata de la subunidad de la T.G.-nativa 12 S. El otro componente detectado en el pico A, con un C.S. de 3,98 S, es muy probablemente Hemoglobina contaminante del pico B.

El pico C, estaba compuesto por una proteína con un C.S. 4,2 S. Esta proteína podría ser Albúmina sérica pues, como hemos visto en la glándula había un gran contenido hemático. Pero experimentos de Mouriz (1966), pasando albúmina sérica humana marcada, junto con E.S. de glándulas humanas normales por Sephadex G-200, mostraron que la albúmina aparece entre los picos A y B. Además, como veremos al exponer el otro caso de bocio congénito, las yodo-proteínas tiroideas "tipo albúmina", también aparecen entre los picos A y B. En Sephadex G-200 se ha comportado igual que el pico C de las demás glándulas estudiadas en el presente trabajo.

La información existente en la literatura referente a la veintena de pacientes catalogados como casos de "defectos de organificación del yoduro", no resulta de mucha utilidad a la hora de intentar dilucidar el mecanismo por el cual ocurre el defecto.

La mayoría de los autores como, Jackson (1954) y Schultz y Cols. (1957) solo basan el diagnóstico de "defecto de organificación del yoduro", en que las descargas de radio-yodo por el tiroides tras la prueba del SCN^- son inferiores al 50 %. Solo Haddad y Cols. (1959) y Gardner y Cols. (1959), hicieron cromatografías de los hidrolizados proteolíticos de las correspondientes glándulas, previamente marcadas con I^* , encontrando que éste estaba en forma de I^- . Aunque es de suponer que se trataba de casos parecidos al presente (nº 13), no aportaron información sobre las proteínas solubles

de dichas glándulas, o sobre sus componentes antigénicos.

En la actualidad se piensa que la falta de incorporación del yoduro se debe a ausencia total congénita de peroxidasa tiroidea, lo cual iría acompañado de una descarga casi completa del I^* atrapado por el tiroides, tras la administración de ClO_4^- o SCN^- , como en el presente caso y en aquellos en los que se ha confirmado que todo el I^* se encuentra como I^- . En aquellos casos en que la descarga no es tan intensa, o incluso menor que el 50 %, se piensa en la posibilidad de que haya una heterogenidad genética de la ausencia de este enzima o que los pacientes sean fenocopias.

2) Bocio congénito por defecto de síntesis de tiroglobulina.

a) Historia y pruebas clínicas.

Enfermo de 16 años nacido de parto normal en Torres de la Alameda (Madrid). Nació con macroglosia pero no le notaron engrosamiento del cuello. El desarrollo ponderal, la deambulación y la dentición fueron algo retrasados. A la edad de tres años fue diagnosticado de bocio. A los 5 años comenzó a tratarse con Proloide (T.G. bovina estandarizada) a una dosis de 3 comprimidos por día, hasta los 13 años, y desde entonces hasta la actualidad la dosis fue de 2 comprimidos diarios. (Cada comprimido equivale a 65 mg de tiroides U.S.P.) No se sabe con qué regularidad siguió este tratamiento.

Este tratamiento se mantuvo hasta su ingreso en el Hospital (Servicio de Med. Interna, Prof. García Ortiz, Ciudad Sanitaria "La Paz"). Se le suspendió entonces temporalmente para facilitar el estudio y diagnóstico. En la exploración se apreció un bocio difuso de un tamaño 4-5 veces lo normal y estatura en los límites bajos de la normalidad para su edad y peso, con un predominio de la longitud del tronco sobre las extremidades inferiores. Radiográficamente se visualizó una disgenesia epifisaria de ambos fémures, causante de esta desproporción. En otras regiones se vio radiográficamente un ligero retraso para su edad en los puntos de osificación. El coeficiente intelectual está en los límites bajos de la normalidad. A su ingreso acusaba un estridor laríngeo; por radiografía de cuello, se vio que era debido a compresión traqueal motivada por el bocio. Estando, pues, indicada la intervención quirúrgica, se le practicó una tiroidectomía total. 48 h. antes de la intervención se le ad-

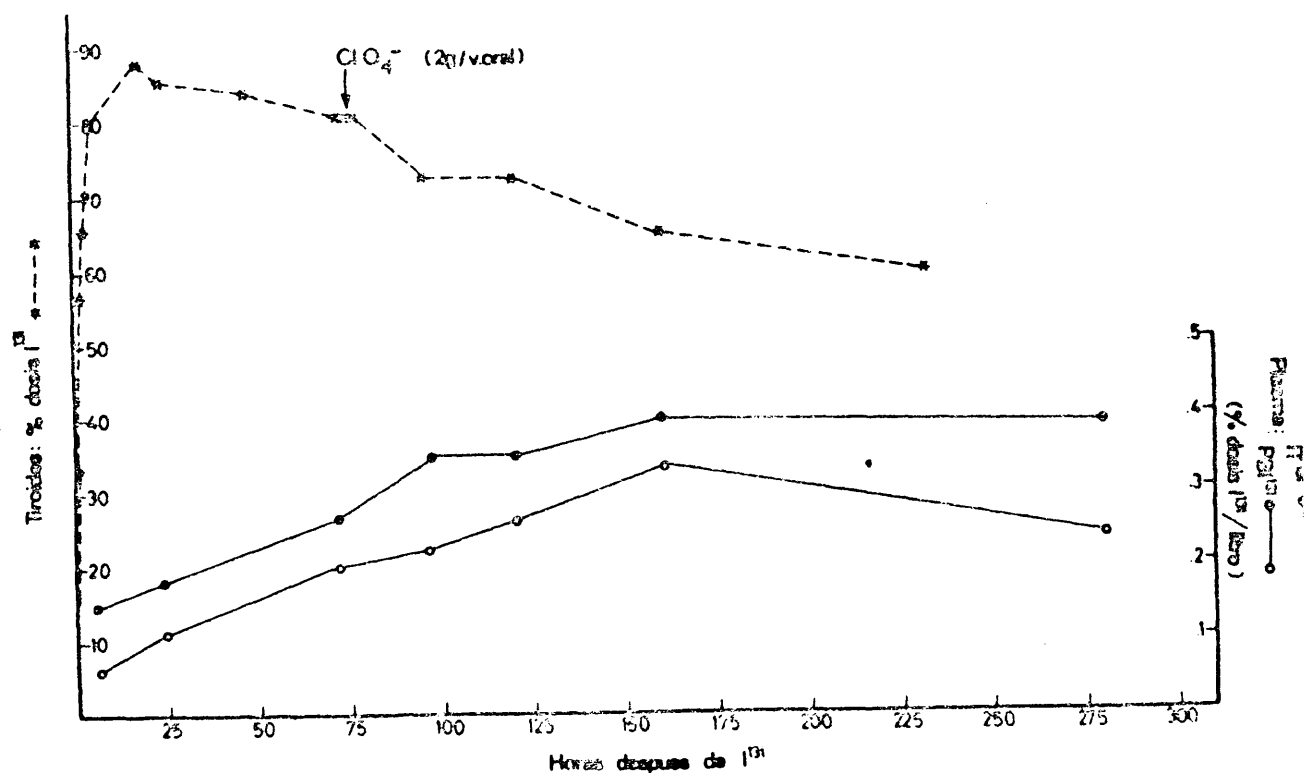


Figura nº 26.

Captaciones de I¹³¹ (50 μ C, vía oral) por la región tiroidea del paciente nº 14. También se representan el IT¹³¹ y PBI¹³¹ en plasma, expresados en % de la dosis de I¹³¹ por litro de plasma. Las captaciones suben rápidamente a valores muy altos y se mantienen en dichos valores durante mucho tiempo (65 % a las 232 horas). Los valores de IT¹³¹ y PBI¹³¹ plasmáticos van ascendiendo lentamente al descender la radioactividad tiroidea. 2 g. de ClO₄K por vía oral no descargaron significativamente el radioyodo del tiroides.

ministraron 250 μ C de I^{125} por vía oral. La pieza operatoria pesó 85 g. Macroscópicamente era un bocio difuso, con aspecto carnoso y sin zonas hemorrágicas focales. En algunas zonas se pudieron aislar unos nodulitos, del tamaño de guisantes gruesos. Los estudios al microscopio óptico y al electrónico, de muestras recogidas de diversas zonas, se exponen en un apartado del presente capítulo.

En los antecedentes familiares destaca que dos - miembros relacionados con su madre padecen bocio y una hermana padece mongolismo.

Las constantes sanguíneas de rutina fueron normales.

El PBI¹²⁷ en plasma un mes después de suspenderse el tratamiento con Proloide fue de 3,1 μ g por 100 ml., cifra que está en límites bajos de la normalidad, según las obtenidas en este laboratorio para normales. El NEI¹²⁷, es decir, el yodo no extraíble en forma hormonal fue del 50 %. Esto indica que la mitad del yodo ligado a proteínas plasmáticas se encuentra unido a un compuesto no hormonal mediante enlaces peptídicos o en forma fuertemente ligada.

La determinación de anticuerpos antitiroideos y anti-mucosa gástrica, amablemente realizadas por la Dra. D. Doniach, resultó negativa.

El TSH medido por radioinmunoensayo, amabilidad de las Dras. M.D. García y L. Cacicedo, según técnica descrita por Utiger y Cols. (1965), fue de 100 mU/ml de plasma,

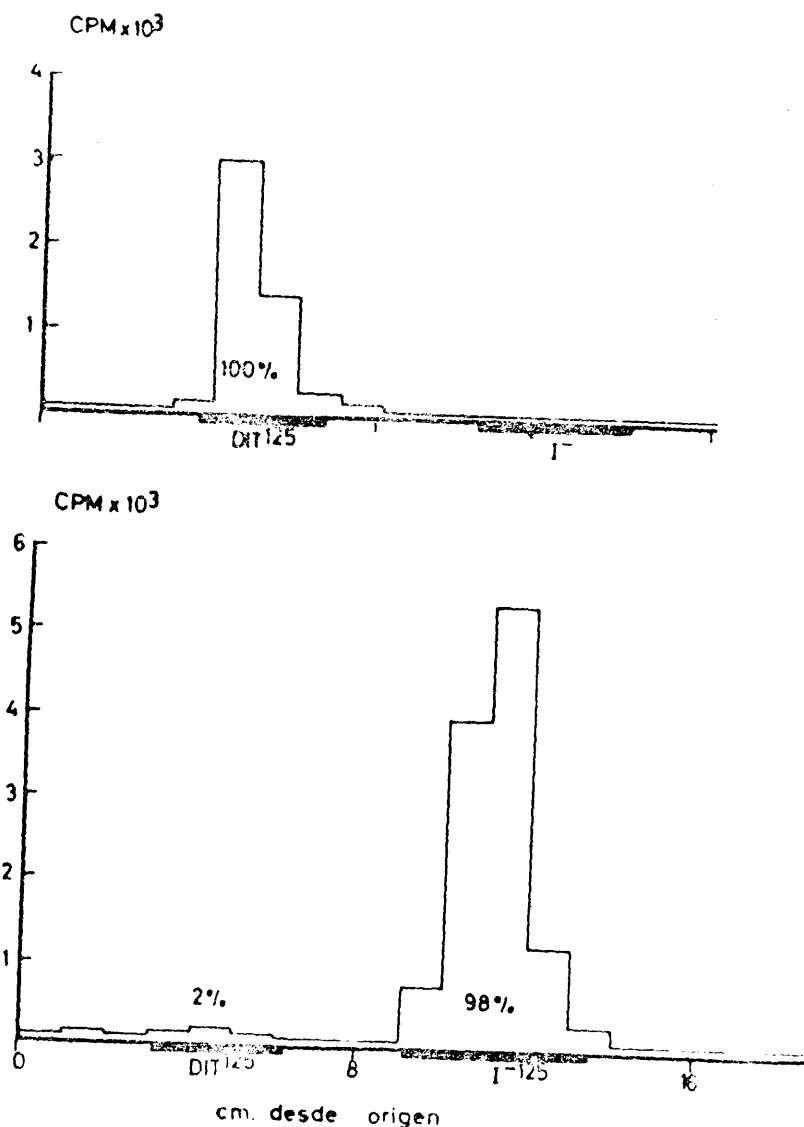


Figura nº 27.

Prueba con DIT¹²⁵ efectuada al paciente nº 14. En la parte superior se representa un cromatograma de una alícuota de la dosis (50 μ C y 3 μ g) de DIT*. En la parte inferior se representa un cromatograma de una alícuota de la orina 8 horas después de administrada la dosis; se observa que prácticamente toda la radioactividad de la orina corresponde al I⁻. Esto demuestra que el paciente ha desiodado muy eficientemente la DIT*.

siendo las cifras normales obtenidas en el mismo ensayo con sueros controles de 15 a 20 mU/ml.

En la Figura nº 26 se representan las captaciones por el tiroides de una dosis trazadora de I^{131} (50 μ C), administrada por vía oral, así como el IT^{131} y PBI^{131} en plasma, expresados en % de la dosis por litro. Como se ve, la captación tiroidea del radioiodo es alta, rápida y mantenida; a las dos horas de administrada la dosis ya alcanza el 56,8 % de ella; la máxima captación es a las 18 h. y fue del 88,3 % y a las 232 h., casi 10 días después, aun persiste en el tiroides el 65 % del I^* administrado. Los valores de IT^{131} y PBI^{131} plasmáticos, inicialmente bajos, ascienden paulatinamente, coincidiendo con la caída de la radioactividad tiroidea. Como se ve, el I^{131} tiroideo no se descargó significativamente con el ClO_4^- , de efecto comparable al SCN^- (véase, como comparación, la Figura nº 19).

En la Figura nº 27 se recoge el resultado de la prueba efectuada con DIT^* . En la parte superior de la figura se representa el cromatograma de una alícuota de la dosis de DIT^{125} administrada (50 μ C y 3 μ g). En la parte inferior de la figura se representa el cromatograma obtenido de una alícuota de la orina del paciente recogida 8 h. después de administrada la dosis de DIT^{125} ; se puede observar como el 98 % de la radioactividad total del cromatograma aparece en la banda correspondiente al I^* . Esto indica que los sistemas deshalogenantes periféricos del enfermo funcionan eficazmente, aun en tiempos tan cortos, y que no hay un defecto "de deshalogenasa de la iodo-tirosina".

b) Métodos.

Las determinaciones de I^{127} , comportamiento en U.A. de las proteínas del E.S., fraccionamiento en Sephadex G-200 de las proteínas del E.S. y cromatografías, se hicieron según técnicas ya descritas en Materiales y Métodos.

c) Resultados.1) Distribución intratiroidea del I^{131} y del I^{127} .

El contenido intraglandular del I^{127} fue de 15,0 mg por 100 gramos de tejido fresco, cifra, como se ve, dentro de los límites descritos para glándulas normales.

En 1 ml. del homogenado glandular, tras tratamiento por ác. Tricloroacético, se recuperó el 94,3 % de la radioactividad en el precipitado final, indicando ésto que la mayor parte del iodo radioactivo estaba ligado a compuestos orgánicos.

La Figura nº 28 corresponde a la distribución proporcional del I^{125} entre los iodo-compuestos, obtenida de un cromatograma de una alícuota del homogenado de la glándula. En la misma figura se indica la proporción del I^* encontrada en los diferentes compuestos. En este cromatograma llamaron la atención los siguientes puntos:

1º.- Un 14,6 % del I^* se encuentra como "origen", y esta es una cifra unas 4-5 veces superior a la encontrada por nosotros en los pacientes nº 1 al nº 13 (Tabla nº 2). 2º.- La proporción de I^* en forma de MIT * es mucho más baja que la encontrada en la mayoría de los aquí estudiados, y la de DIT * es superior. Esto no se debe al elevado porcentaje de Or * , pues-

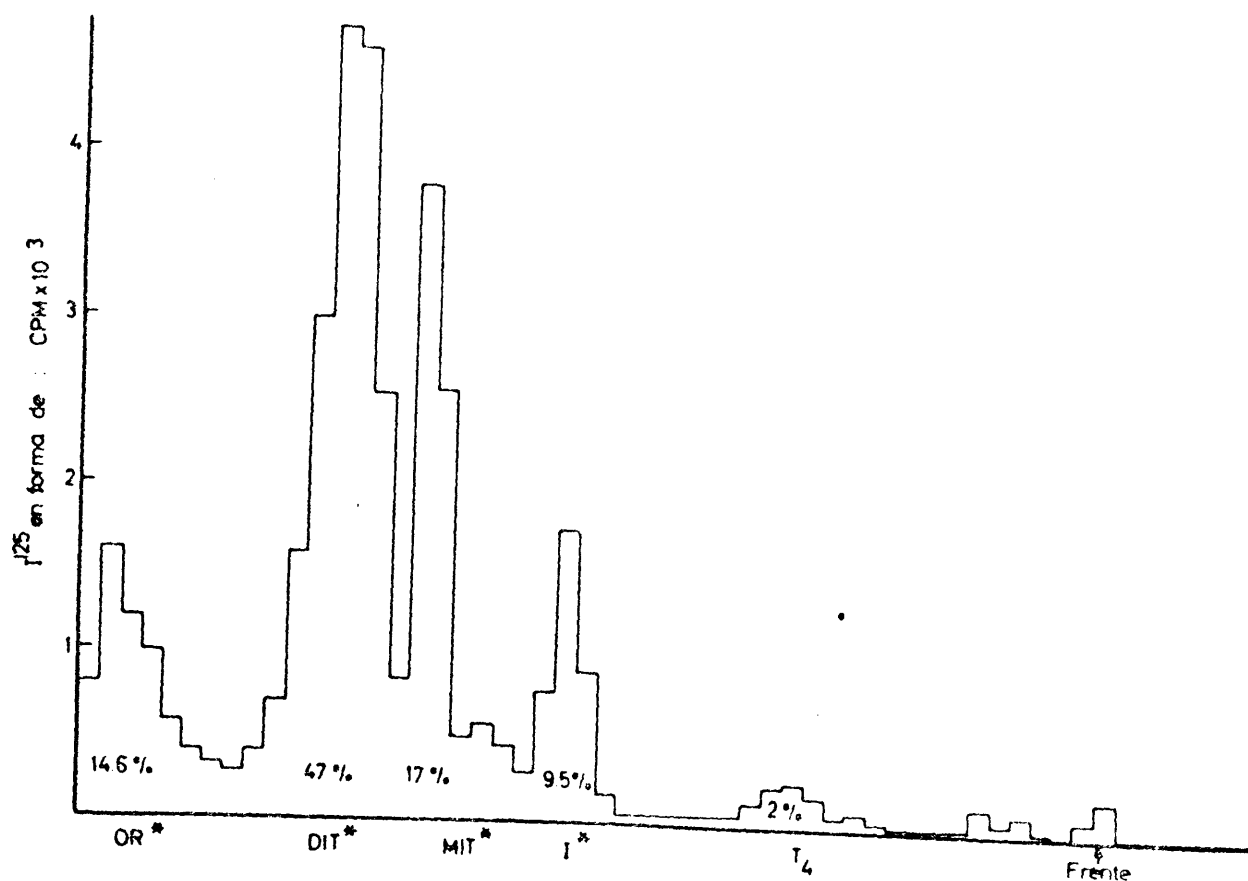


Figura nº 28.

Cromatograma que indica la distribución del I^{125} entre los iodo-compuestos tiroideos del hidrolizado de la glándula nº 14. Las proporciones de MIT^* y DIT^* se encuentran en unos valores parecidos a los de las glándulas normales[†]. Efectivamente el cociente MIT^* / DIT^* es de 0,35, valor que es incluso menor del que se encuentra en glándulas normales. Contrasta con esto la escasa proporción de T_4^* . El origen^{*} está elevado, con respecto a las otras glándulas del presente trabajo.

[†] En el sentido de que en éstas hay más % de DIT que % de MIT.

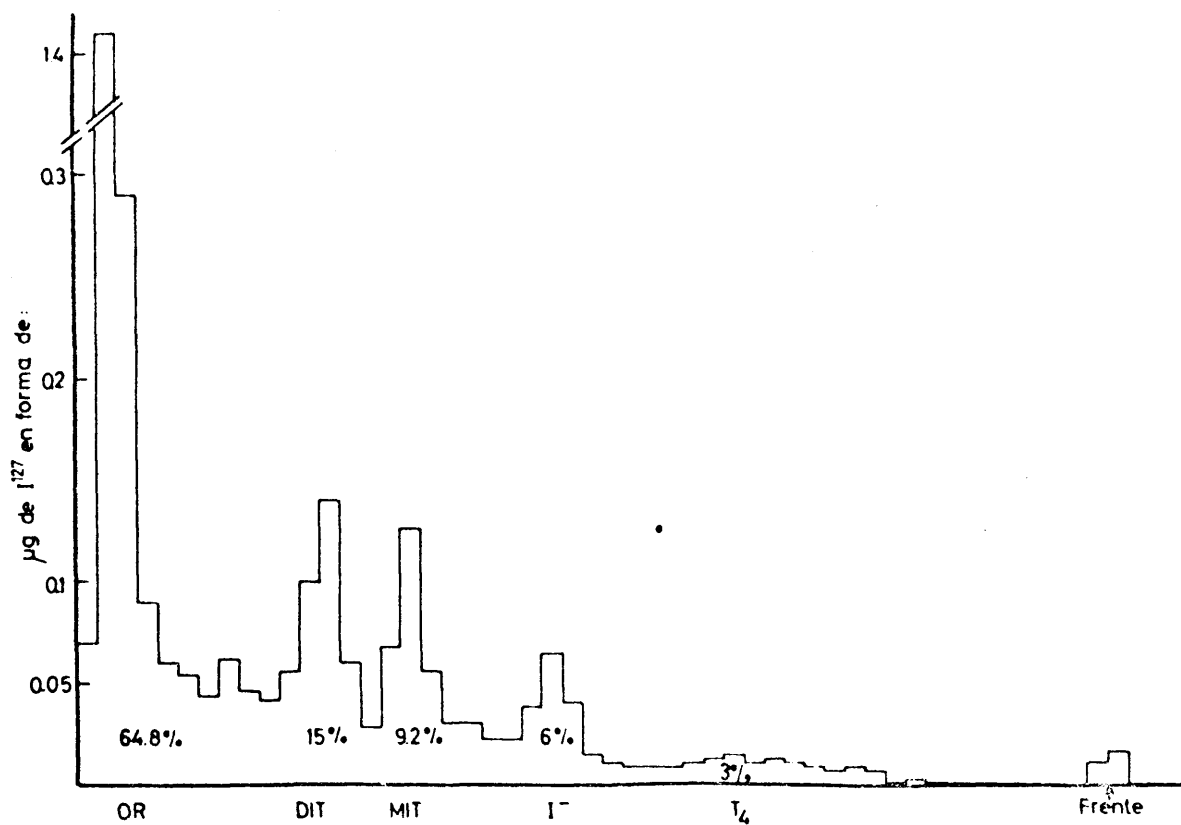


Figura nº 29.

Cromatograma que nos indica la distribución del I^{127} entre los iodocompuestos tiroideos de un hidrolizado de la glándula del paciente nº 14. Lo que más llama la atención es la elevadísima proporción de I en forma de material en el origen (OR). El cociente MIT / DIT sigue estando más bajo que el de las glándulas normales (0,61). Contrasta con ello la escasa proporción de T_4 , pues valores tan bajos de T_4 suelen ir acompañados de cocientes MIT / DIT superiores a 1-1,5.

to que el cociente $\frac{MIT^*}{DIT^*}$ también es notablemente inferior a los encontrados por nosotros (Tabla nº 4) y para glándulas normales por Ermans y Cols. (1968, a, b) (Tabla nº 5).

3º.- La proporción del I^* incorporado a T_4^* es notablemente inferior a la hallada por los citados autores para glándulas normales (Tabla nº 3) y es del mismo rango que la hallada por nosotros en la mayoría de los BMN (Tabla nº 2).

La Figura nº 29 nos da la distribución del I^{127} (o I estable) entre los iodocompuestos, obtenida por cromatografía de la misma alícuota usada para el cromatograma radioactivo. En dicha figura se indica la proporción del I^{127} que se encuentra en cada uno de dichos compuestos. En este cromatograma se observa lo siguiente: 1º.- Casi dos tercios del yodo estable se encuentra como material en el origen, en un compuesto(s) que no es(o son) hidrolizable por la Pronasa. 2º.- El cociente MIT/DIT está también disminuido con respecto a las glándulas normales de Ermans y Cols. (1968, a, b), aunque en menor grado que el anterior. 3º.- El porcentaje de I^{127} incorporado a T_4 está disminuido, igual que en el cromatograma de los iodocompuestos marcados.

2) Fraccionamiento en Sephadex G-200 de las proteínas solubles.

La Figura nº 30 muestra el fraccionamiento del E.S. de esta glándula. Como se ve, mantenemos la misma denominación de los picos que en los casos descritos hasta ahora.

La zona de elución correspondiente a la T.G., pi-

FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-200 DE LAS PROTEINAS SOLUBLES DE UN ES DEL BOCIO
 CONGENITO POR DEFECTO DE SINTESIS DE T.G.

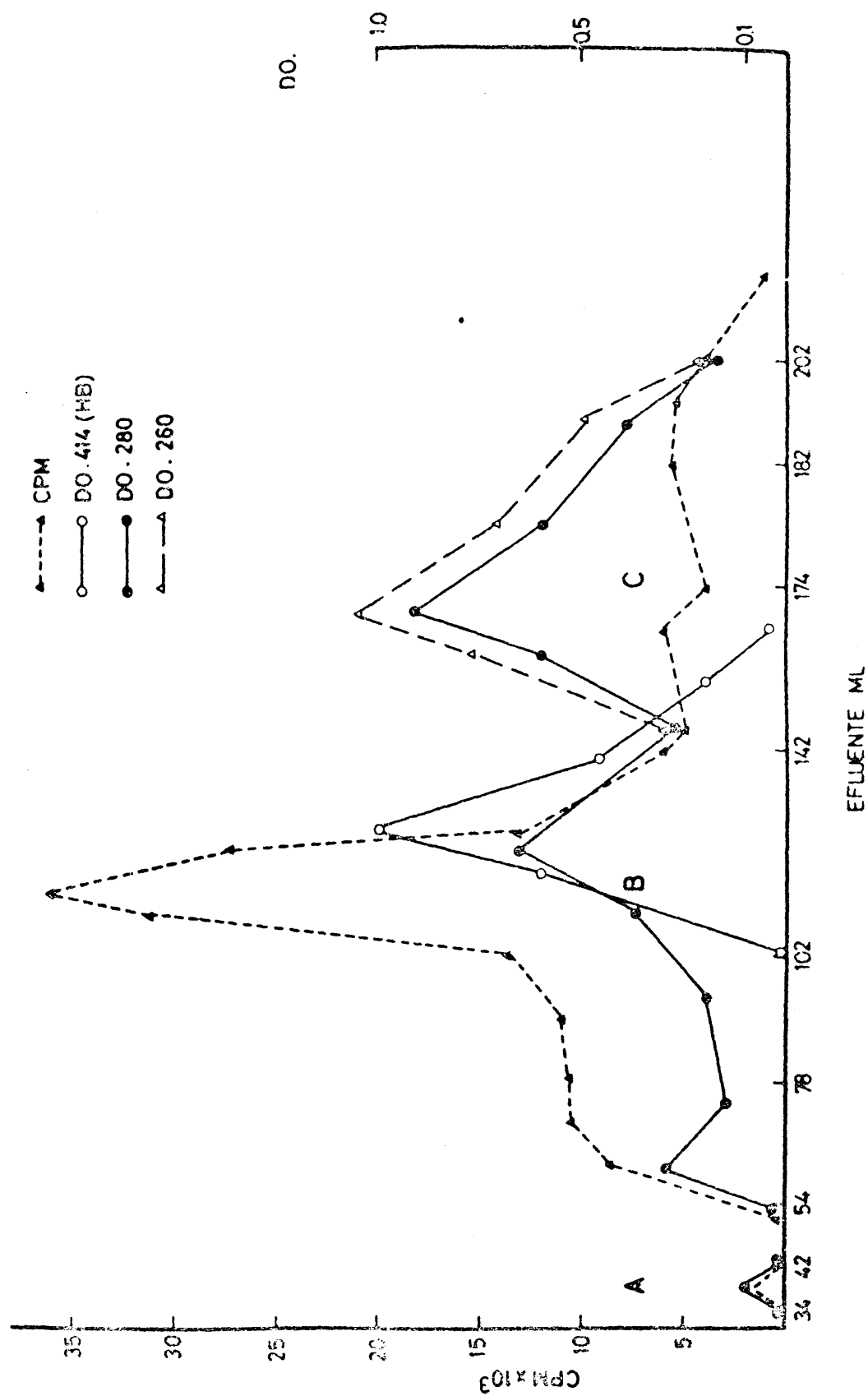


Figura nº 30.

Las anomalías de este patrón se detallan en el texto.

co A, representa un porcentaje de recuperación con respecto a las proteínas totales del 0,63 %. A partir de los 55 ml (pico B), se inicia un pico marcado con I^{125} , que enseguida se aplana, pero desde los 100 ml a los 140 ml se hace mucho más agudo, se superpone en su parte descendiente el pico de la Hb. la recuperación proporcional fue del 57,53 % de las proteínas totales. Desde los 140 ml. de elución, hasta el final, aparece otro pico (C) muy poco radioactivo y en el cual la densidad óptica de los ác. nucleicos (D.O. 260m μ) es superior a la de las proteínas (D.O. 280m μ). Este pico C comprendió el 41,83 % de las proteínas totales.

Como se ve, la proporción mayor de las proteínas recuperadas corresponde al pico B. Por la forma de la curva éste parece estar compuesto por dos proteínas radioactivas, además de la Hb.: una de ellas sería la comprendida entre los volúmenes de elución de 55 ml. a 100 ml. y la otra, con una radioactividad más de tres veces superior a ésta sería la comprendida entre los 100-140 ml.

La proporción de proteínas solubles recuperada en el pico C, es de tres a cuatro veces superior a la que se encontró en glándula normal.

En conjunto, el patrón de fraccionamiento obtenido en esta glándula es diferente al obtenido en todas las demás glándulas en los siguientes puntos: 1º.- la escasísima proporción recuperada en el pico A, correspondiente a la T.G., y 2º.- que prácticamente toda la radioactividad aparece ligada al pico B.



Figura nº 31.

Comportamiento en U.A. de un E.S. de la glándula del paciente nº 14. Concentración proteica, 15 mg / ml a 56.000 rpm. En las 6 primeras fotografías (parte superior) el espectro aparece compuesto por un componente con un C.S. de 4 S. que en las 6 últimas fotografías (parte inferior) se desdobra en otro componente con un C.S. de 6 S.

El pico B fue repurificado en una columna de DEAE-Sephadex-A-50, utilizando como eluyente un gradiente de ClNa (entre 0 y 1 M) y el patrón obtenido fue idéntico al de Sephadex G-200, excepto que la Hb. salió netamente separada y, como era de esperar, sin radioactividad.

3) Estudio de las iodoproteínas solubles en U.A.

La Figura nº 31 muestra el comportamiento en la U.A. del E.S. de esta glándula. El régimen de centrifugación fue de 56.000 r.p.m., a una concentración proteica de 15 mg/ml.; se tomaron fotografías a intervalos regulares hasta el minuto 52.

En las 6 primeras fotografías parece que el E.S. está compuesto por una sola banda, cuyo C.S. fue de 4 S. Pero a partir de la fotografía nº 7 se va separando otro componente, cuyo C.S. fue de 6 S. Como puede verse, no aparece ninguna de las formas conocidas de la T.G.

4) Electroforesis de las iodoproteínas solubles en Acetato de celulosa.

En la Figura nº 32 se muestran los resultados obtenidos con una muestra del E.S. Denominamos a las bandas por su movilidad, comparándolas con las conocidas de suero normal humano y líquido cefalorraquídeo humano. En la parte inferior de la figura aparece la radioactividad incorporada a cada una de ellas. Puede apreciarse que ésta es más intensa en las bandas con movilidad similar a la albúmina y pre-albúmina y que las bandas con movilidad α_1 y α_2 también aparecen algo marcadas. Además es de destacar en este espectro 1º) que

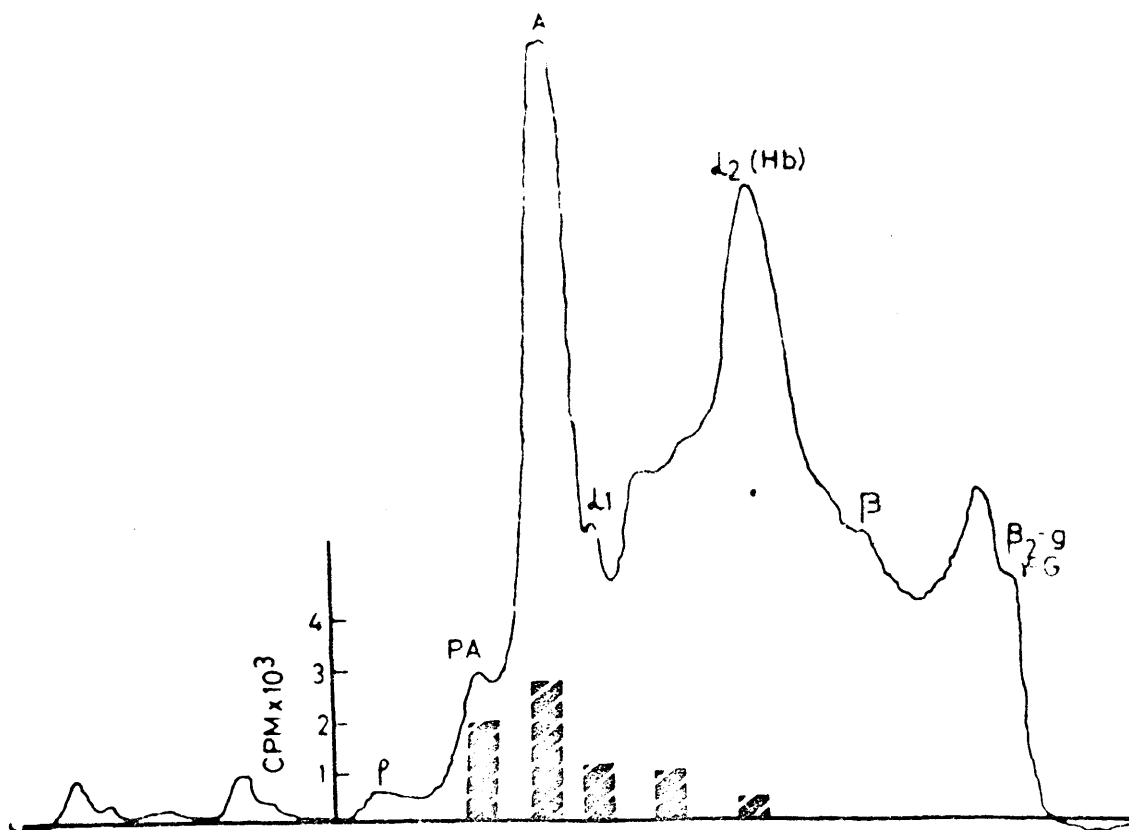


Figura nº 32.

Densitometría de una electroforesis en acetato de celulosa de un E.S. de la glándula del paciente nº 14. Las bandas se denominan según sea su movilidad comparada a las de proteínas del suero humano normal. En la parte inferior, las barritas representan la radioactividad incorporada a cada banda; ésta es más intensa en las bandas correspondientes a albúmina y pre-albúmina; ésta última se encuentra aumentada con respecto a sueros normales y a continuación de ella aparece un componente ρ que no se encuentra en sueros humanos normales y no contiene radioactividad.

la banda correspondiente a la pre-albúmina aparece en una proporción superior a la que se encuentra en el espectro de un suero normal humano y además está marcada. 2º) La aparición de un componente con mayor movilidad electroforética que la pre-albúmina y que correspondería a las denominadas proteínas β . Su pequeña cantidad no permitió aclarar si está o no marcada.

5) Estudios inmunológicos.

En la Figura nº 33 se ve por inmunoelectroforesis que el E.S., puesto frente a suero anti-albúmina sérica humana, forma un evidentísimo arco de precipitación. Además, este arco es radioactivo, como se ve en la autorradiografía correspondiente. Esto indica que en el E.S. hay una proteína marcada con I^* que tiene determinantes antigénicos comunes con los de la albúmina sérica humana. Usando suero anti-prealbúmina sérica humana y el E.S. no se forma arco alguno de precipitación. Tampoco hubo arco de precipitación entre el E.S. y el suero del enfermo, indicando que no hay auto-anticuerpos circulantes contra las proteínas de su propio tiroides.

Al poner E.S. del paciente frente a suero anti-T.G. humana normal, no hemos podido obtener arco alguno de precipitación. Antes de aceptar esta conclusión negativa, hemos utilizado mayor número de técnicas inmunológicas diferentes que las que habitualmente hemos usado en las otras glándulas estudiadas. Además, el E.S. fue perconcentrado unas 10 veces, con el fin de que en caso de haber algo de

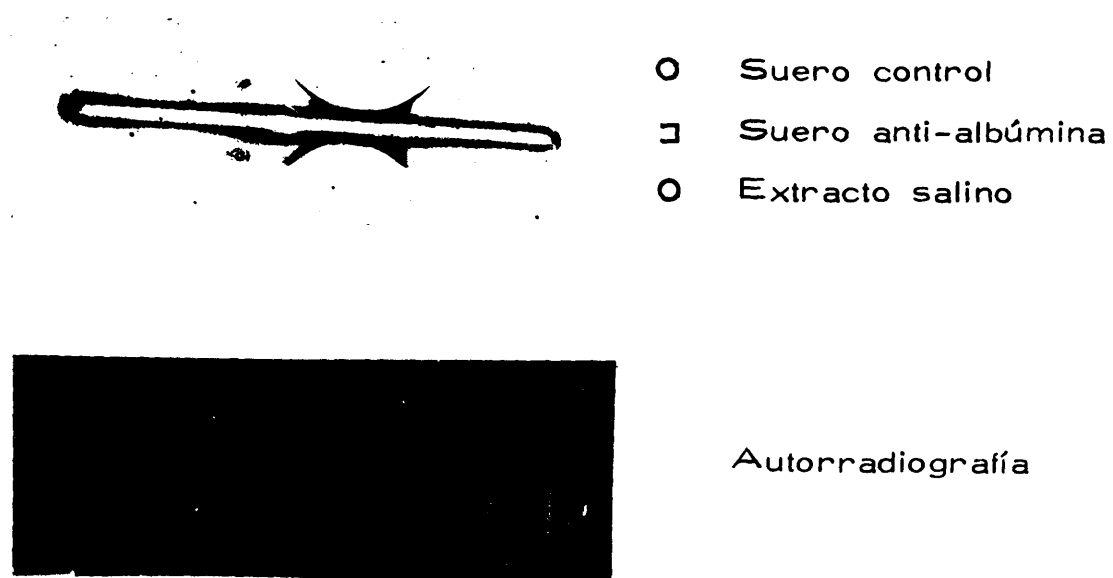


Figura nº 33.

Inmunoelectroforesis en gel de agar del E.S. de la glándula del paciente nº 14, frente a suero anti-albúmina sérica humana. Se observa como se formó un evidentísimo arco de precipitación. Este además es radioactivo, como se observa en la autorradiografía de la parte inferior de la Figura.

No se obtuvo ningún arco de precipitación cuando el E.S. se puso frente a suero anti-T.G. humana normal, ni con esta técnica ni con la de doble difusión en agar (Placas de Ouchterlony).

T.G., ésta pudiese reaccionar frente al antisuero.

6) Microscopía Óptica y Electrónica.

Los cortes realizados en parafina y teñidos con hematoxilina eosina, presentan en la Figura nº 1-O un tejido epitelial compacto y trabecular, semejante a un órgano tiroideo fetal; estos cordones aparecen entremezclados a elementos conectivo-vasculares. En otras zonas esta proliferación de los cordones epiteliales tiroideos (Figura nº 2-O) se aprecia menos compacta y más trabecular, ofreciendo en ocasiones falsas imágenes pseudofoliculares desprovistas de coloide pero con un contenido de detritus celulares; en ambos campos se visualizan escasamente la presencia de algunos microfóliculos desprovistos de coloide.

Se efectuaron numerosas observaciones electromicroscópicas, de las que seleccionamos fotográficamente las más demostrativas.

Entre las células tiroideas se observan microfóliculos en los cuales destacan, junto con la existencia de microvellosidades, la escasa densidad electrónica de la sustancia coloide, por aparente ausencia de la misma (Figura nº 1-E, Mf). En los bordes microfoliculares se observan algunos desmosomas (Figura nº 1-E, de)

En el citoplasma llama la atención, la gran hipertrofia del ergastoplasma y del complejo de Golgi (Gc) y la exis-

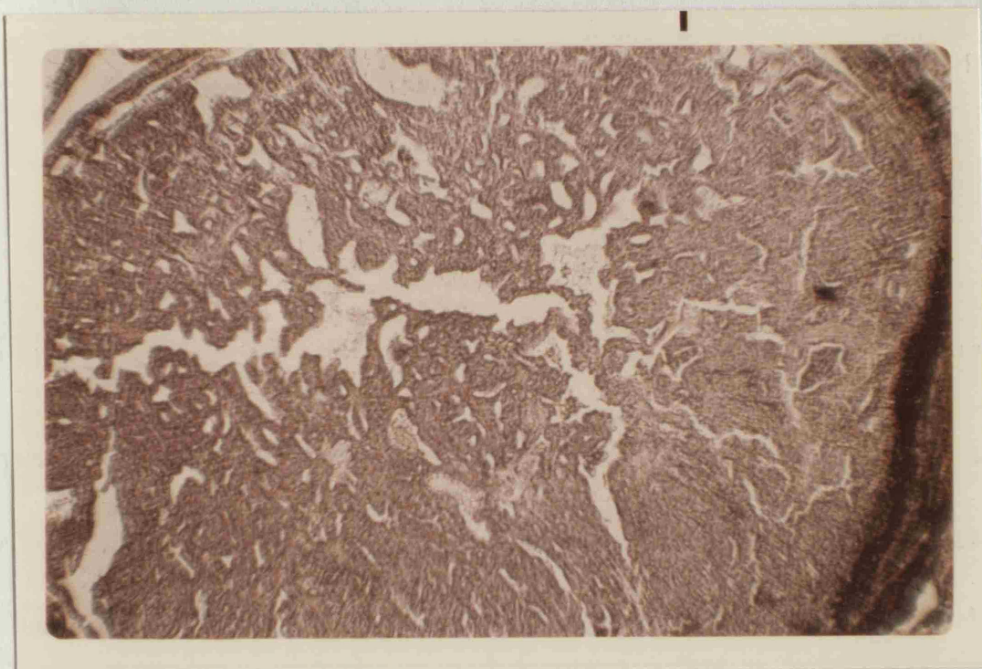


Figura nº 1-O.

Uno de los aspectos histológicos más característicos de la glándula del paciente nº 14 vista al microscopio óptico. Se observa un tejido epitelial compacto y trabecular, semejante a un órgano tiroideo fetal; estos cordones aparecen entremezclados a elementos conectivos vasculares. A veces se observan algunos microfolículos desprovistos de coloide.

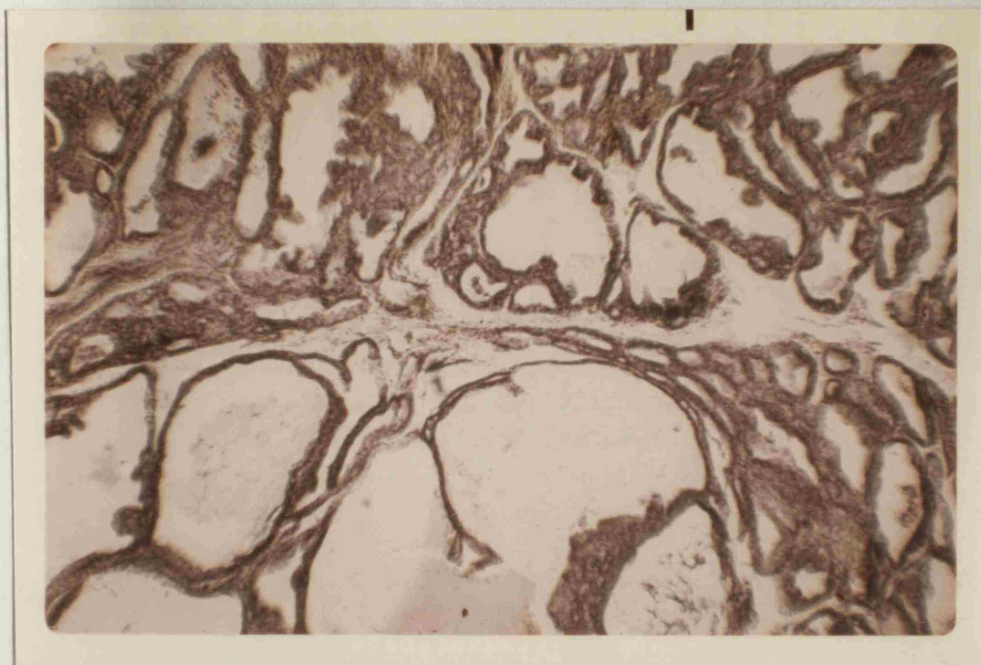


Figura nº 2-O.

Otro aspecto histológico de la glándula del paciente nº 14 vista al microscopio óptico. La proliferación de cordones epiteliales tiroideos es menos compacta y más trabecular, ofreciendo en ocasiones falsas imágenes pseudofoliculares sin coloide pero con contenido de detritus celulares. Igual que en la Figura nº 1-O aparecen algunos microfolículos desprovistos de coloide.

tencia de una serie de organoides de aspecto lisosómico, formados por materiales de distintas densidades electrónicas y que podrían corresponder a la expresión morfológica de gránulos de lipofucsina (Figura nº 1-E, Lp).

Otras veces se ven cavidades microfoliculares con abundantísimas microvellosidades (Figura nº 2-E, Mf) y el citoplasma celular presenta las mismas características reseñadas anteriormente: un complejo de Golgi bien desarrollado (Gc), hipertrofia del retículo endoplásmico rugoso (Er), cuerpos densos (db) y abundantes microvesículas.

En la zona basal de las células foliculares (Figuras nº 3-E y nº 4-E) la hipertrofia del citoplasma celular es muy similar a la de las zonas apicales, acúmulo de lipofucsina (Lp), hipertrofia del retículo endoplásmico rugoso (Er). En algunas imágenes llama la atención, la gran hipertrofia del ergastoplasma (Figura nº 4-E, Er) dentro de cuyos sacos puede visualizarse un material amorfo de aspecto coloide; yuxtapuestas al ergastoplasma se disponen abundantes mitocondrias densas. En algunas de estas células, puede observarse un comienzo de degeneración vacuoliforme (Figura nº 4-E, V).

En el conjunto de las observaciones realizadas al microscopio óptico y electrónico, destacan la proliferación cordonal y compacta o cordonal y trabecular de las células tiroideas, el enorme desarrollo de sus organoides ergastoplásmicos, golgianos y mitocondriales, presencia de microfolículos y ausencia de coloide. A través de estas observaciones podemos establecer que las células foliculares de este bocio, presentan un

un estado de hiperfunción.



Figura nº 1-E.

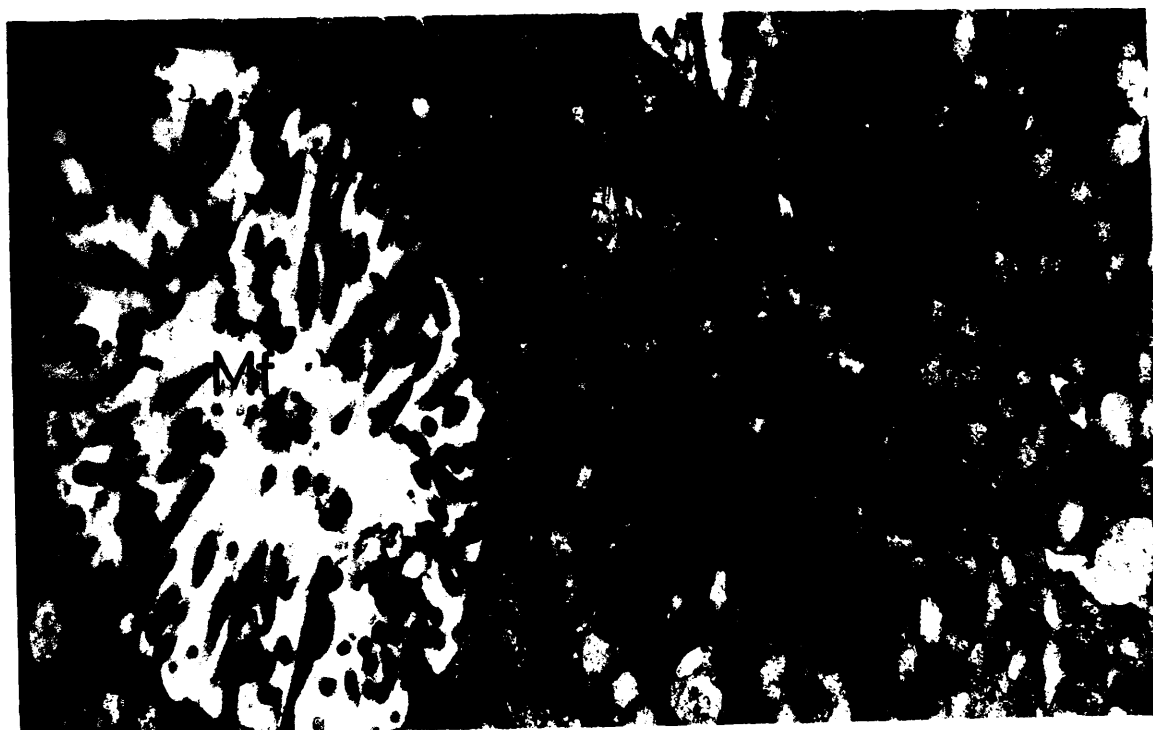


Figura nº 2-E.

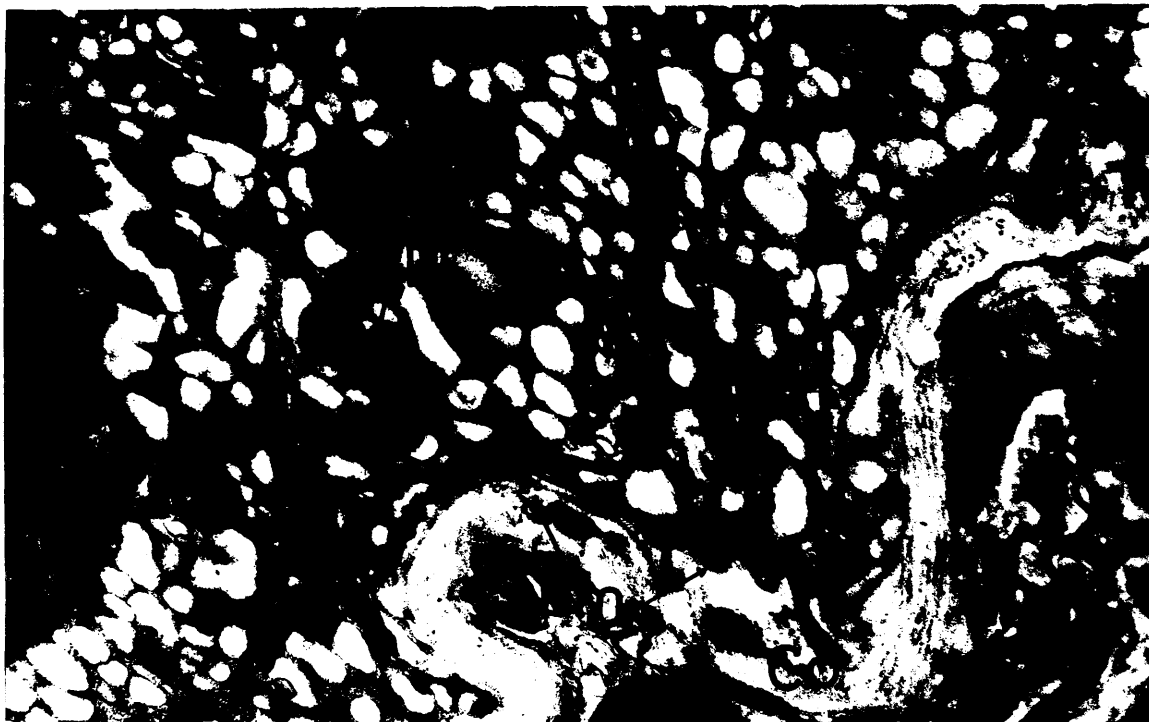


Figura nº 3-E.

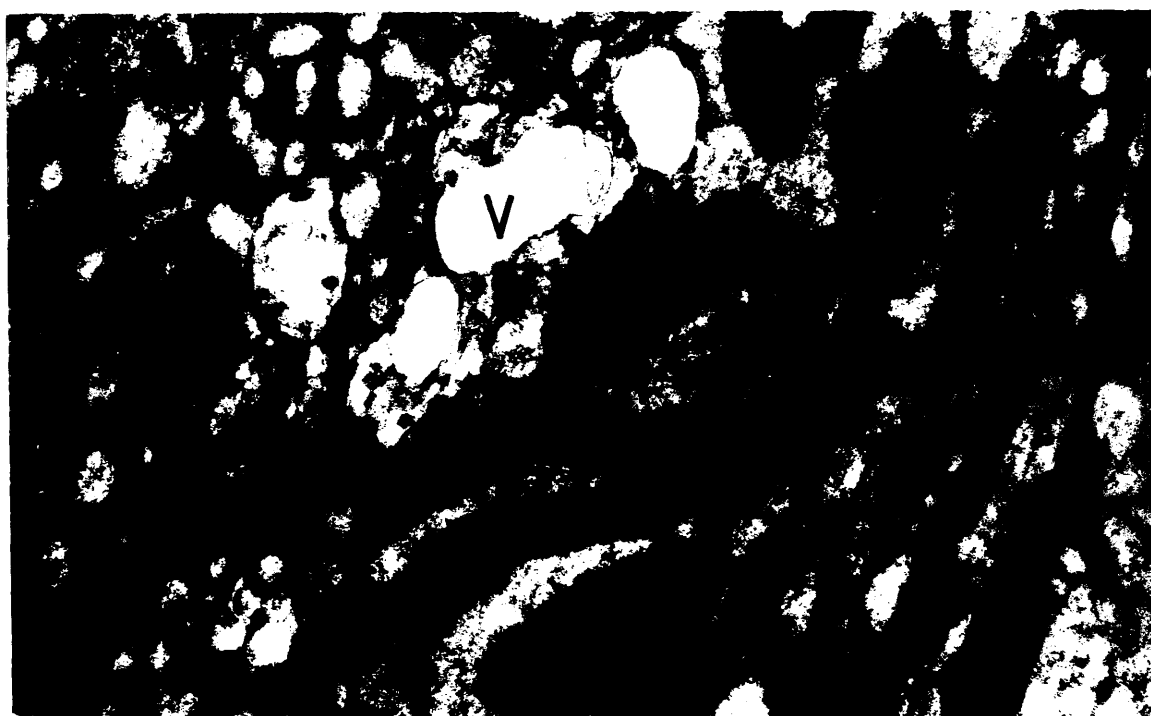


Figura nº 4-E.

d) Resumen.

Se trata de un enfermo con bocio desde la infancia, bocio que ha persistido a pesar de haber estado sometido a tratamiento con hormonas tiroideas desde los cinco años de edad. Este tratamiento sí ha sido suficiente para evitar muy graves trastornos en el crecimiento y desarrollo intelectual y somático. Es de destacar en los antecedentes familiares que dos miembros de la familia relacionados con la madre padecen alteraciones tiroideas y una hermana es mongólica.

Los datos más característicos de las pruebas clínicas efectuadas son:

1º.- Al mes de suspender el tratamiento con tiroides, el PBI¹²⁷ plasmático está en los límites bajos de la normalidad (3,1 μ g/100 ml.), pero la mitad de este iodo ligado a proteínas plasmáticas no corresponde a T_4 y T_3 , como se ve en la determinación del NEI¹²⁷. Las cifras de TSH plasmático, aumentadas a más de 5 veces lo normal, nos indican que los niveles de hormonas tiroideas circulantes son lo suficientemente bajas como para desencadenar éste aumento de TSH, aumento que se refleja asimismo en el aumento de peso del tiroides (85 g.).

2º.- La captación por el tiroides de una dosis trazadora de I^{131} es alta y rápida, manteniéndose aumentada a tiempos muy prolongados, como se ve en la Figura nº 26. Además el I^* no es descargable por ClO_4^- , indicando que el isótopo se en-

cuentra en la glándula, en forma de compuestos orgánicos.

3º.- Por medio de la prueba con DIT¹²⁵, recogida en la Figura nº 27, se ve claramente que los sistemas deshalogenantes periféricos del paciente funcionan con toda normalidad. Ya veremos en la Discusión de este caso, los motivos por los que efectuamos esta prueba en este enfermo.

De los resultados obtenidos del estudio de la glándula de este paciente destacan los siguientes:

Lo que más llama la atención al considerar la distribución del I (I^{127} y I^*) entre compuestos tiroideos es la discrepancia entre el porcentaje del I^* encontrado en forma no hidrolizable (Or^* , 14 %) y el porcentaje del I^{127} encontrado en el mismo compuesto (64 %). Esto indica que casi dos tercios del iodo estable se encuentra en un compuesto(s) que no es (o son) hidrolizable(s) por Pronasa y que este hecho no se hubiese detectado.

En segundo lugar, los cocientes MIT/DIT, tanto químico como radioactivo, son muy inferiores a los encontrados por Ermans y Cols. (1968, a, b) para glándulas normales y esto ocurre a expensas de que la proporción en forma de MIT es muy inferior a la proporción en forma de DIT. Al mismo tiempo, en ambos cromatogramas la proporción de iodo incorporado a T_4 está muy disminuida, con respecto a la hallada por los citados autores para glándulas normales, y es del mismo rango que la hallada por nosotros en la mayo-

ría de los BMN (Tabla nº 2). El contenido intraglandular de I^{127} es de 15,0 mg. por 100 g. de tejido fresco, cifra dentro de los límites descritos para glándulas normales.

El estudio de las proteínas solubles de la glándula de este paciente ha dado los siguientes resultados:

1º.- Como se ve en la Figura nº 30, el patrón del fraccionamiento en Sephadex G-200 del E.S. de esta glándula se caracteriza por que prácticamente es nula la recuperación de proteínas en el pico A (zona de elución de la T.G.), recuperándose la radioactividad y más de la mitad de la proteína en el pico B. De este pico B, mediante repurificación en columna de DEAE-Sephadex-A-50, se ha podido separar la Hb. (no marcada) de otras dos proteínas marcadas con I^* . El pico C, aumentado proporcionalmente, (41 % de las proteínas totales), con respecto a las glándulas normales, presenta muy poca radioactividad incorporada.

2º.- El comportamiento en U.A. del E.S. obtenido de esta glándula (Figura nº 31) se caracteriza por la aparición de una sola banda con C.S. de 4 S, en las 6 primeras fotografías, de la cual se separa, a partir de la fotografía nº 7 otro componente con un C.S. de 6 S. Como puede verse, no aparece ninguna de las formas conocidas de T.G. Comparando estos espectros con los resultados del fraccionamiento obtenido en Sephadex G-200, se aprecia como en la U.A. aparecen únicamente dos componentes, mientras que en el Sephadex se

obtienen, excluyendo la Hb. contaminante, tres componentes, dos de ellos marcados por el radioiodo y el otro prácticamente sin marcar.

3º.- La electroforesis en Acetato de Celulosa del E.S. de esta glándula, ha puesto de manifiesto que está compuesto por proteínas con idéntica movilidad a las que se obtienen del suero normal humano, con la particularidad de que las bandas con movilidad similar a la albúmina y pre-albúmina sérica están mucho más marcadas por el radioiodo que las bandas con movilidad similar a las y . Además la banda de pre-albúmina aparece en una proporción superior a la que aparece en suero normal humano y se aprecia un componente con movilidad "pre-pre-albúmina", que no aparece en los sueros humanos normales que correspondería a las llamadas proteínas

De los estudios inmunológicos realizados con el E. S. de esta glándula hay dos datos sobresalientes: en primer lugar la ausencia de arco de precipitación del E.S. puesto frente a anti-T.G. humana normal. Indica que no hemos detectado en las proteínas solubles de esta glándula, ninguna que se comporte inmunológicamente como T.G. normal humana. En segundo lugar, (Figura nº 33) en este E.S. hay una proteína marcada por el radioiodo que tiene los mismos determinantes antigénicos que la albúmina sérica humana. Aunque en Acetato de Celulosa se visualiza una banda en el E.S. con movilidad electroforética similar a la pre-albúmina sérica humana, no hemos obtenido evidencia de que los determinantes antigénicos

sean comunes con la pre-albúmina sérica normal humana.

Por otro lado tampoco se han obtenido datos en favor de la existencia de autoanticuerpos tiroideos ni de anticuerpos anti-T.G. y anti-mucosa gástrica, circulantes en el suero del paciente.

II - ESTUDIOS REALIZADOS EN ANIMALES EXPERIMENTALES

A - Generalidades.-

Como se ha detallado en Materiales y Métodos, se han estudiado dos grupos de ratas. Uno de ellos se alimentó durante 13 meses con una dieta baja en iodo (entre 0,05 y 0,09 μg por g de dieta), y a este grupo le denominamos B (bociosos). Simultaneamente, se puso un grupo control con animales de la misma edad y peso que los del grupo anterior, a los que se alimentó con idéntica dieta suplementada con IO_3^- , (el contenido en iodo era de 1,7 μg por g de dieta) y a este grupo le denominamos C (controles). Ambos grupos de animales bebieron agua destilada. 24 h antes del sacrificio se inyectaron intraperitonealmente, con 15 μC de I^{131} /rata, con el fin de hacer el estudio de la cinética de este isótopo y de marcar las iodoproteínas tiroideas.

B - Situación metabólica periférica y niveles circulantes de hormonas tiroideas.-

Como se ve en la Tabla nº 7 no hay diferencias entre los dos grupos de animales en cuanto a peso corporal final ni a longitud de los mismos. El peso total del tiroides es de unas cuatro veces superior en los animales del grupo B que en los animales del grupo C.

Tanto el IT^{131} como el PBI^{131} en plasma, al tiempo del sacrificio, (24 h después de administrado el isótopo),

T A B L A N º 7
.....

	<u>BOCIOSAS</u>	<u>CONTROLES</u>
Peso corporal final (g)	307,7 \pm 32	271 \pm 30
Longitud nariz-ano (cm)	22,5 \pm 0,4	22,1 \pm 0,7
Peso del tiroides (mg)	100,3 \pm 33,5	24,4 \pm 5,5
<u>PLASMA:</u>		
I^{131} total (% dosis/100 ml)	30,5 \pm 5,9	4,3 \pm 0,3
PBI I^{131} (% dosis/100 ml)	27,5 \pm 5,8	2,5 \pm 0,4
I^{127} total (μ g/100 ml)	2,5 \pm 0,2	3,6 \pm 1,5
PBI I^{127} (μ g/100 ml)	2,1 \pm 0,3	2,8 \pm 1,3
a) T_4 total (μ g/100 ml) [†]	4,5	5,0
b) T_4 "libre" (como % de T_4 total)	0,18	0,37
c) T_4 "libre" total (en ng/100 ml)	8,1	18,5
d) T_3 "libre" (como % de T_3 total)	0,51	0,63
e) Relación d / b	2,83	1,70
TSH (en mU/ml) ^x	2,4	2,46

Se resumen en ella datos de 8 ratas a dieta pobre en iodo (bociosas) y de 8 animales a la misma dieta, suplementada con iodo (controles). Se dan los valores medios de cada dato \pm d.s. Cuando ésta no aparece, se debe a que las determinaciones se realizan en "pools" de plasmas.

Las determinaciones de T_4 y T_3 total y "libre" se efectuaron en el laboratorio Boston Medical Inc. de Boston por el Dr. Benotti.

Las determinaciones de TSH en plasma fueron realizadas por la amabilidad de la Dra. M.D. García, por un radioinmúnometodo desarrollado en nuestro laboratorio. Los resultados están expresados en unidades arbitrarias de TSH de rata, puesto que no hay standard internacional de TSH de rata. 1 U = 1 hipófisis de rata normal adulta; por bioensayo corresponde a 0,21 U de la standard internacional de TSH bovino.

son notablemente superiores en los animales del grupo B que en los del grupo C, en el caso del PBI^{131} están 10 veces más aumentados los valores y en el caso del IT^{131} el aumento es de más de 7 veces. Como luego se verá, estos datos concuerdan con la curva de captación, expuesta en la Figura nº 34, en la que se ve una rápida y alta desaparición tiroidea del isótopo en los animales del grupo B, que contrasta con el lento turnover de los animales C. Ambos datos (los de la Tabla nº 7 y los de la Figura nº 34) nos indican un turnover acelerado del isótopo trazador en los animales del grupo B.

El IT^{127} y PBI^{127} plasmáticos, dan valores inferiores en los animales del grupo B con respecto a los del grupo C, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas; esto mismo se confirma en los datos de T_4 total según las determinaciones del Dr. Benotti, y que confirman los resultados obtenidos de nuestras determinaciones de PBI^{127} en plasma.

Los valores de T_4 "libre" están, en cambio, disminuidos a más de la mitad en los animales del grupo B con respecto a los animales del grupo C. Sin embargo, la proporción de T_3 "libre" circulante se encuentra en el mismo rango de valores en ambos grupos de animales. Como resultado, la relación entre las proporciones de T_3 "libre" % / T_4 "libre" % está significativamente aumentada en el plasma de los animales del grupo B con respecto a los del grupo C. Como se verá, este dato está de acuerdo con lo hallado en la relación proporcional de las iodotironinas tiroideas, tanto químicas como radioactivas, (Figura nº 35).

En estos datos lo que más destaca es que, si bien los valores proporcionales de T_4 "libre" circulante están muy disminuidos en los animales del grupo B, con respecto a los del grupo C, no lo está la proporción de T_3 "libre" plasmática. Parece que como consecuencia de este aumento de la proporción de T_3 "libre", se contrarrestan los efectos de la disminución de la T_4 "libre"; por lo menos de forma adecuada para que los animales del grupo B, no hayan dejado de crecer y poner peso al igual que los del grupo C. También los datos de TSH en plasma, realizados por la amabilidad de la Dra. M.D. García, por un radioinmunométodo desarrollado en nuestro laboratorio (García, M. D. y G. Morreale de Escobar, 1970), en el mismo "pool" de plasma en el que se llevaron a cabo las demás determinaciones de la Tabla nº 7, está de acuerdo con la idea de que los animales del grupo B, producían la suficiente cantidad total de hormonas tiroideas (entre T_4 y T_3), como para que no hubiese un aumento notable de TSH circulante, comparándolo con el de los animales del grupo C. Fue, sin embargo, el peso del tiroides unas 4 veces superior en las ratas del grupo B que en las del grupo C.

C - Captación y distribución intratiroidea del I^{131} y del I^{127} . -

La Figura nº 34 muestra, para ambos grupos de animales, la curva de captación por el tiroides de una dosis trazadora de I^{131} (15 μ C por rata), administrada 24 h antes del sacrificio. Los datos representados corresponden a los

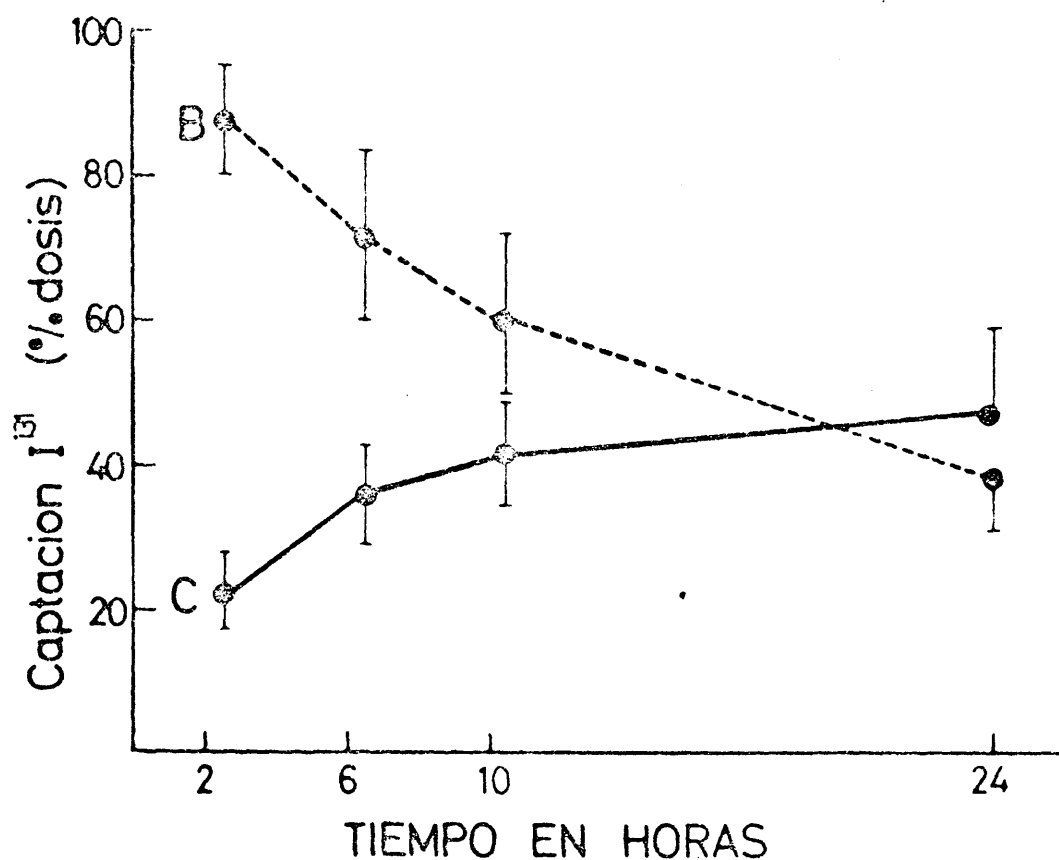


Figura nº 34.

Curvas de captación por el tiroides de una dosis de I^{131} (15 μ C), administrada i.p. a cada grupo de ratas 24 horas antes del sacrificio. Se representan valores medios \pm d.s. a distintos tiempos. Los animales bociosos (B) tienen una captación alta y rápida del trazador seguida de su acelerada desaparición del tiroides; a las 24 horas se cruza con la curva de las ratas controles (C), aunque las trayectorias son opuestas desde el principio.

valores medios (\pm d.s.) de la radioactividad en la región del cuello, medida a distintos tiempos y expresadas en % de la dosis administrada. Se ve que los animales del grupo B tenían una captación alta y rápida (87,1 % de la dosis a las $2 \frac{1}{2}$ h) seguida de una acelerada desaparición del tiroides del trazador captado. Las curvas de los grupos B y C se cruzan a las 24 h y, como se ve siguen trayectorias opuestas desde su origen.

En la Figura nº 35 se representan las distribuciones porcentuales del radioisótopo (I^{131}) y del iodo estable (I^{127}) entre los diversos compuestos iodados del tiroides, obtenidas por cromatografía de una alícuota del homogenado de ambos grupos. Como puede verse, las relaciones MIT/DIT y T_3/T_4 , tanto de los compuestos estables como las de los radioactivos, están sensiblemente aumentadas en los animales del grupo B, con respecto a los del grupo C. En lo referente a los cocientes MIT/DIT este aumento se hace a expensas de un aumento en la proporción de I incorporado a MIT y de una disminución en la proporción de I incorporado a DIT. En los animales B la relación T_3/T_4 aumenta a expensas fundamentalmente de un aumento en la proporción de I incorporado a T_3 . También puede apreciarse en esta figura, que en los animales del grupo B la proporción de I^{127} que aparece como material en el "origen", es más del doble de la proporción del I^{131} que aparece en el mismo material, mientras que en los animales del grupo C ambas proporciones son aproximadamente iguales.

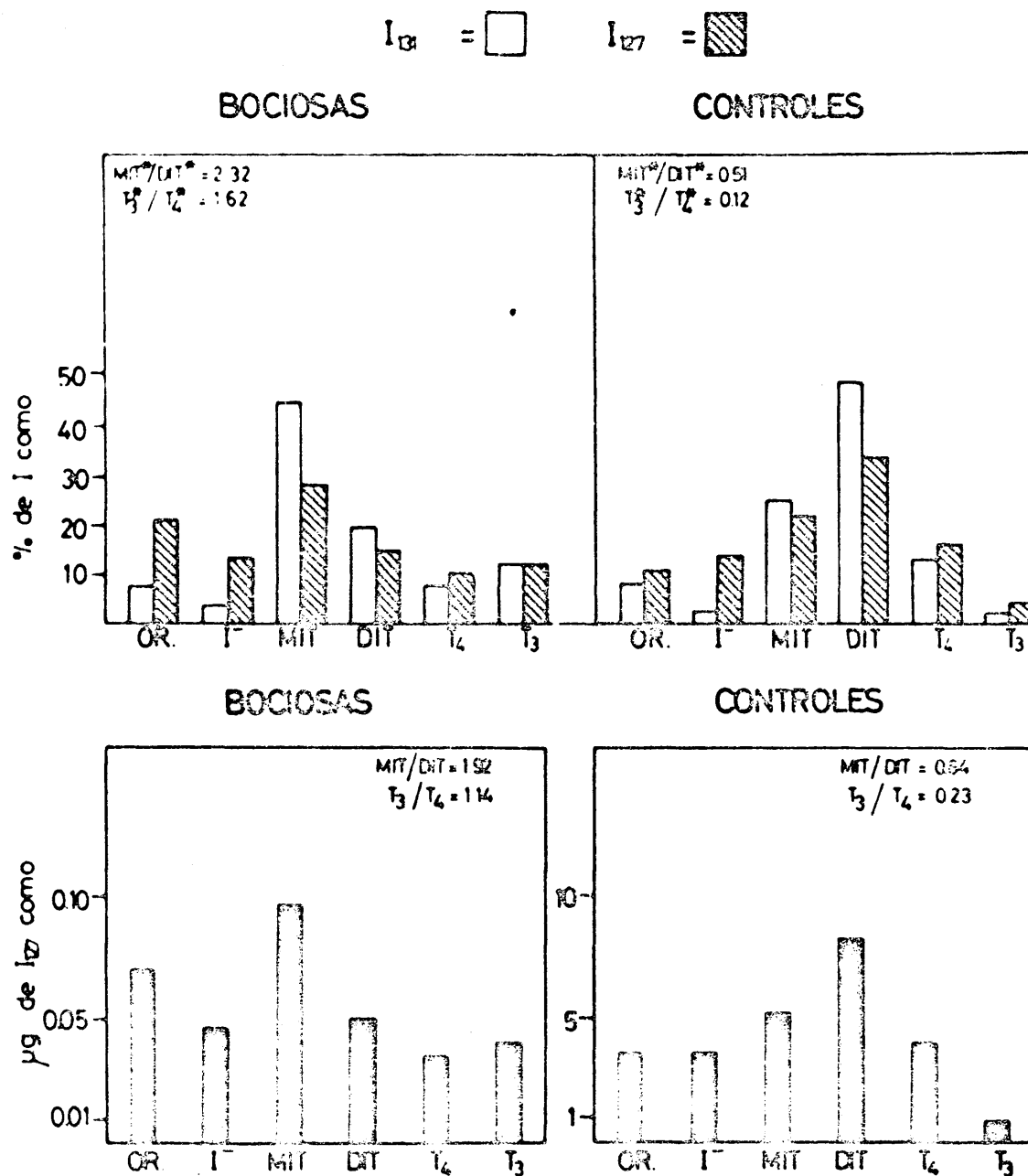


Figura n^o 35.

Distribución porcentual del I^{131} y del I^{127} entre los iodocompuestos glandulares de cada grupo de ratas. En la parte inferior están representadas las cantidades absolutas de I^{127} en cada compuesto. Las relaciones MIT / DIT y T_3 / T_4 están muy aumentadas en el grupo B con respecto al C, tanto si se mide I^{127} como I^{131} .

En la parte inferior de la Figura nº 35, se han representado las cantidades absolutas del I^{127} contenido en cada iodocompuesto y por glándula. Se han podido calcular a partir de la distribución proporcional del I^{127} en cada iodocompuesto y del I^{127} total de la glándula. De esta forma puede verse que, aunque las proporciones relativas de cada iodocompuesto son de órdenes de magnitud parecidos para los dos grupos de animales (parte superior de esta figura), la realidad es que en los del grupo B, las cantidades absolutas son mucho más pequeñas que en los del grupo C. Nótese que la escala empleada para los valores del grupo B es cien veces mayor que la empleada para el grupo C. Así, hay más de 50 veces más MIT, y más de 150 veces más DIT en los animales controles que en los animales bociosos. Asimismo, hay más de 100 veces más T_4 y más de 20 veces más T_3 en los controles que en los bociosos. Esto no es de extrañar, si tenemos en cuenta que el contenido en I^{127} por glándula es unas 80 veces superior en los animales del grupo C que en los del grupo B.

Con esto queremos señalar un error que con frecuencia aparece en muchas investigaciones: el de interpretar las proporciones de los iodocompuestos tiroideos, como si éstas expresaran el contenido real de los mismos en glándula.

D - Estudio de las iodoproteínas tiroideas solubles.

1) Análisis en U.A.

En la Figura nº 36 se muestra el espectro obtenido en U.A. del extracto de las iodoproteínas solubles de los tiroides de las ratas del grupo C. Las fotografías están tomadas a intervalos regulares, a partir del tiempo en que se alcanzó el régimen de centrifugación (56.000 r.p.m.). La progresión de las bandas es de izquierda a derecha, según van numeradas correlativamente, hasta la fotografía nº 12 que se tomó en el minuto 78. Se trabajó a una concentración proteica de 15 mg/ml. Las proporciones de cada una de ellas se dan en la Tabla nº 8 y se comentarán conjuntamente con los resultados allí expuestos. Aparecen 4 bandas fundamentales. La más rápida, que se aprecia con toda claridad en las 5 primeras fotografías corresponde a una proteína con C.S. de 27 S. La siguiente, más lenta y proporcionalmente mayoritaria y que puede verse en las 7 primeras fotografías corresponde a una proteína con un C.S. de 19 S. A continuación aparece otra banda muy tenue, que se aprecia claramente desde la fotografía nº 4 a la fotografía nº 9, y que corresponde a una proteína con un C.S. de 12 S. Desde la fotografía nº 1 a la nº 7 se ve una última banda con un C.S. de 4 S, de la cual, a partir de la fotografía nº 8, se desdobla otra, muy tenue, con un C.S. de 6 S.

En la figura nº 37 vemos el espectro en U.A. de las iodoproteínas solubles obtenidas de los tiroides de las ratas del grupo B, usando iguales condiciones experimentales que

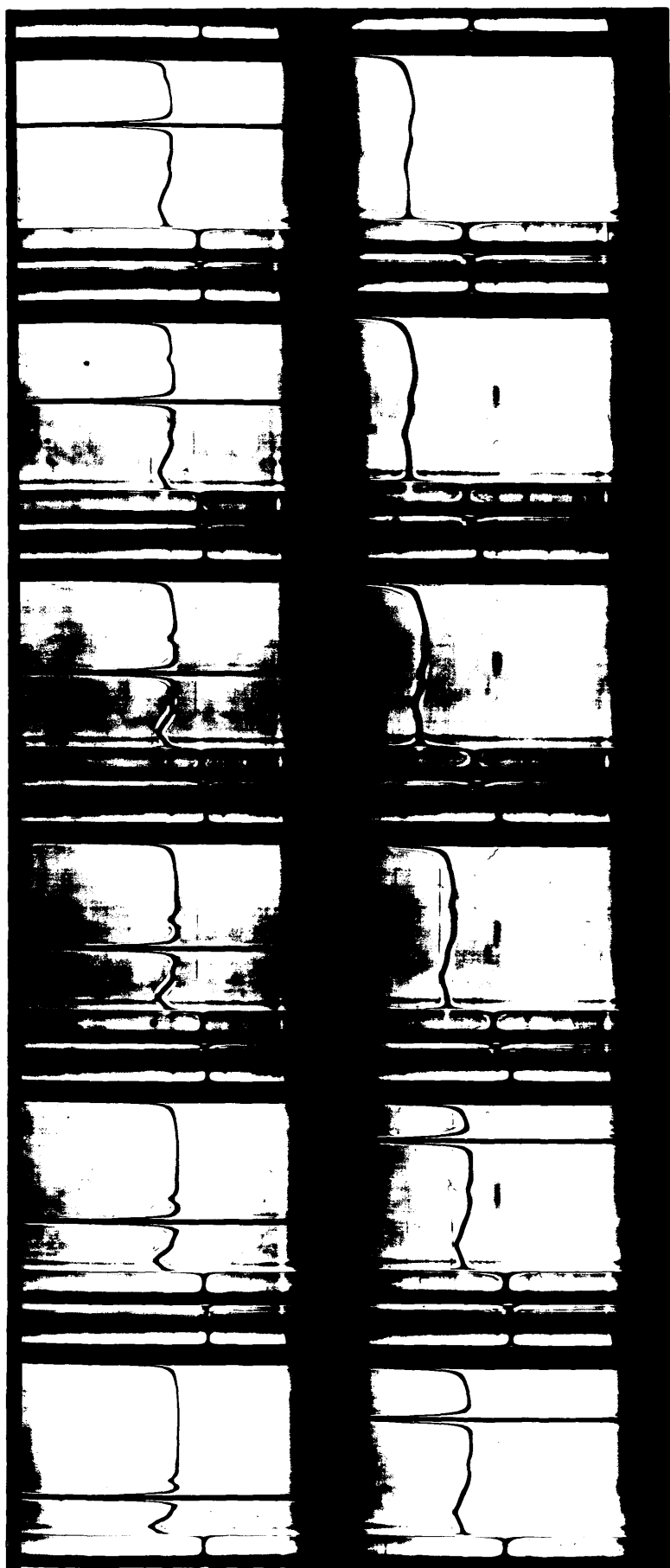


Figura nº 36.

Separación en U.A. de un extracto de las iodoproteínas solubles de los tiroides del grupo de ratas controles (C). Concentración proteica de 15 mg / ml y a 56.000 rpm. Aparecen 4 bandas principales: una más rápida (27 S), otra mayoritaria (19 S) y una 4 S, que a tiempos largos se desdobra en otra 6 S.

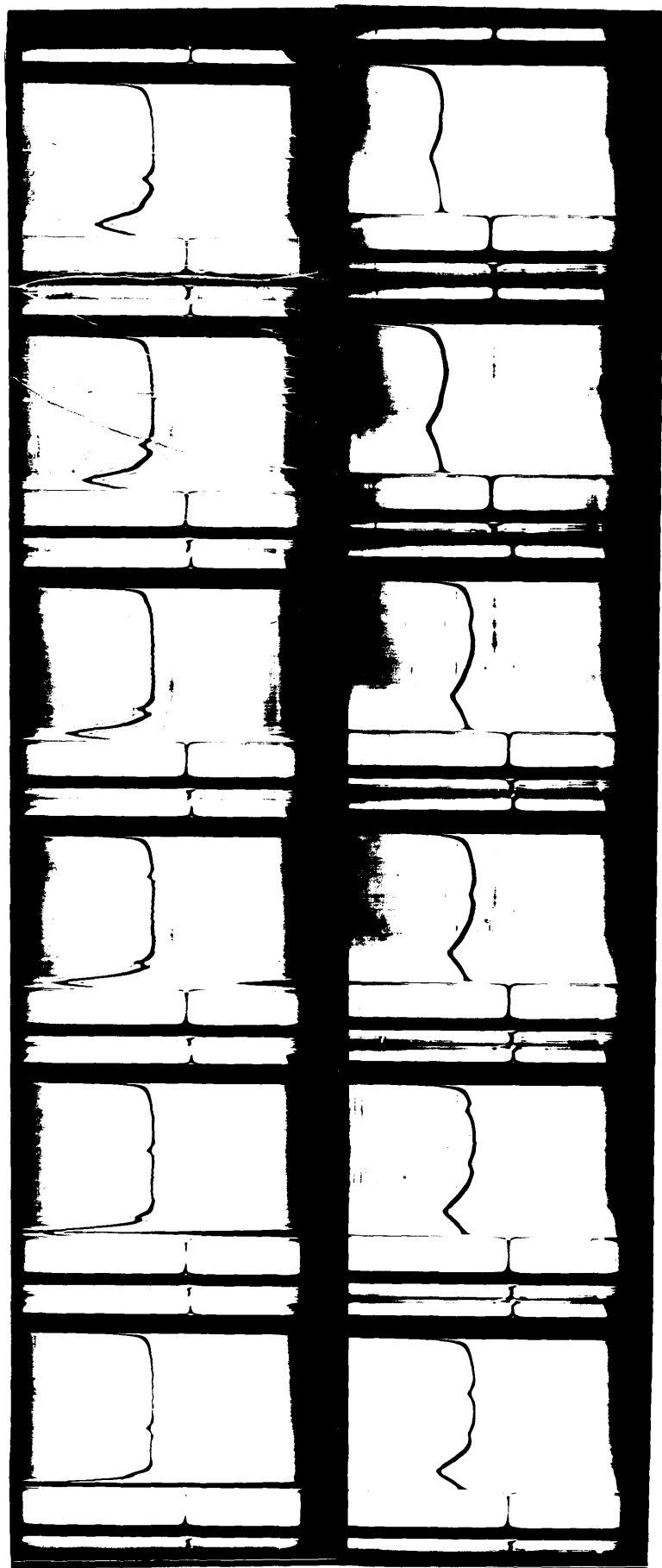


Figura nº 37.

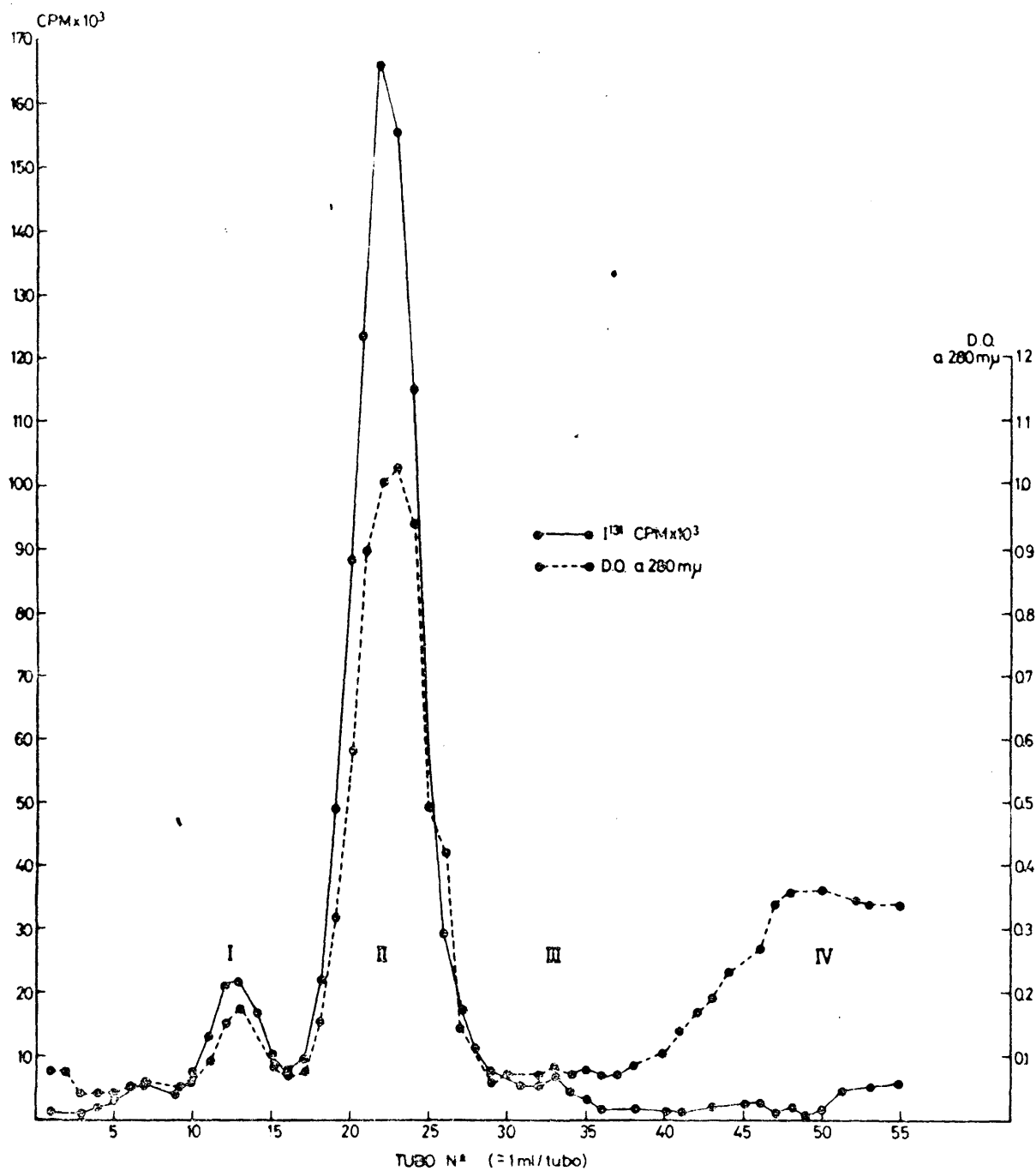
Separación en U.A. de un extracto de las iodoproteínas solubles de los tiroides de las ratas bociosas (B), en iguales condiciones experimentales que en la Figura anterior. Aquí el componente más rápido dio un C.S. de 66 S y el componente 4 S aparece como el mayoritario. Este componente 4 S también se desdobra en otro 6 S a tiempos largos de centrifugación.

para el grupo anteriormente descrito, Las fotografías, sin embargo, están tomadas a tiempos diferentes de centrifugación que en el caso anterior. En las tres primeras fotografías se aprecia un pequeño pico, en la zona de las proteínas más rápidas y por tanto más pesadas. En la fotografía nº 4, este pico ya está sedimentado. Al realizar medidas del C.S., resultó ser de 66 S. No sabemos aun qué representa esta banda. La banda siguiente que se aprecia con claridad, únicamente desde la fotografía nº 3 a la nº 8 es la que corresponde a un C.S. de 19 S. Como se ve a simple vista, esta banda se representa en una proporción mucho menor que en el espectro correspondiente a las ratas del grupo C. Desde la fotografía nº 6, en que comienza a separarse hasta la nº 10, aparece claramente un componente cuyo C.S. es de 12 S. Desde la fotografía nº 3 hasta la nº 10, se ve una banda con un C.S. de 4 S y que resultó ser inicialmente la mayoritaria. Desde la fotografía nº 10 hasta el final, esta banda se desdobla y aparece una banda con C.S. de 6 S, al igual que ocurrió en el caso de los animales C.

2) Fraccionamiento en Gradiente de Sacarosa.

En la Figura nº 38 se representan las curvas del fraccionamiento obtenidas con el extracto de iodoproteínas solubles de los tiroides de las ratas del grupo C. La proporción proteica recuperada en cada uno de los picos, así como la recuperación total, se dan en la Tabla nº 8 y se comentan con los resultados que en ella se exponen. Desde los 10 ml a los 15 ml, aparece un pico (pico I) netamente diferenciado tanto por la medida de su radioactividad como por la medida de su

PURIFICACION EN GRADIENTE DE SACAROSA DE LAS PROTEINAS DE UN EXTRACTO SOLUBLE
DE LOS TIROIDES DE LAS RATAS DEL GRUPO C



I

S

Figura n° 38.

I = parte inferior del tubo.

S = Superficie del tubo.

PURIFICACION EN GRADIENTE DE SACAROSA DE LAS PROTEINAS DE UN EXTRACTO SOLUBLE DE LOS TIROIDES DE LAS RATAS DEL GRUPO B.

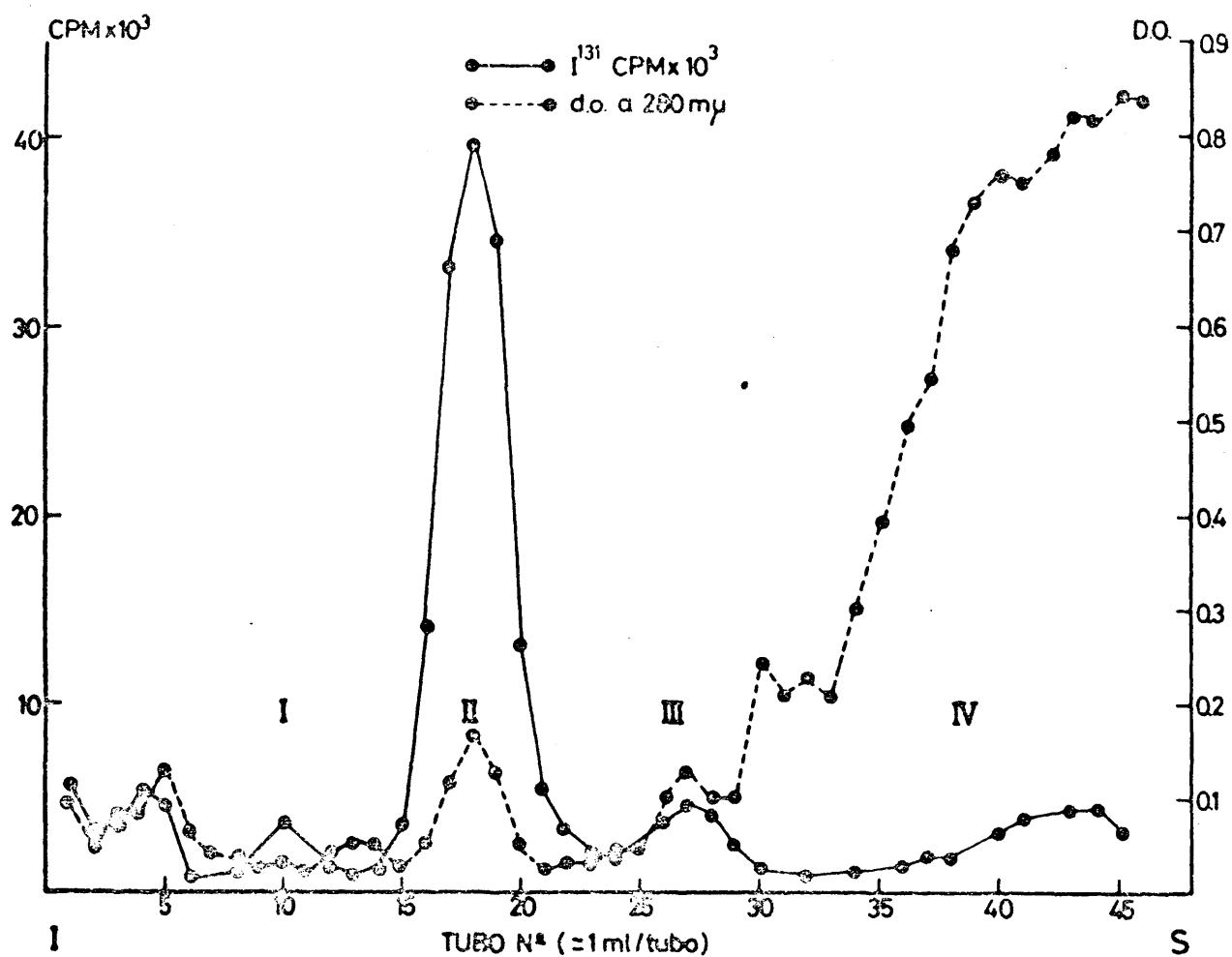


Figura n^o 39.

I = parte inferior del tubo.

S = Superficie del tubo.

densidad óptica. Sabemos por experimentos previos realizados con proteínas con C.S. conocidos, así como por el fundamento de la técnica, que esta zona de aparición corresponde a la proteína de más peso molecular: en nuestro caso a la 27 S.

Desde los 17 ml a los 29 ml aparece un gran pico proteico, intensamente marcado (pico II), y cuya zona corresponde a proteínas de menor peso molecular y C.S. de 19 S. Desde los 31 ml a los 36 ml se ve un pequeño pico (pico III) que corresponde a las proteínas con un C.S. de 12 S, con algo de radioactividad incorporada y desde los 38 ml hasta el final, un último pico (pico IV), en el que la radioactividad específica (I^{131} /proteína) es muy pequeña. Como vemos en esta figura, esta técnica es capaz de separar todas las bandas proteicas que se visualizan en la U.A., excepto la banda correspondiente a la proteína 6 S. Creemos que las iodoproteínas con C.S. 4 S y 6 S, se recuperan juntas en este último pico (IV).

La Figura nº 39 representa los resultados del fraccionamiento del extracto de las iodoproteínas solubles de los tiroides de las ratas del grupo B, obtenido con la misma técnica en otra centrifugación. En esta figura vemos que aparecen igualmente 4 picos, pero con las siguientes características: en los picos I, II y III, se recupera más del 90 % de la radioactividad, mientras que el pico IV, que es el mayoritario en cuanto a concentración proteica se refiere, es de menor radioactividad. Como en el caso anterior, con este fraccionamiento se obtuvieron picos correspondientes a las bandas visualizadas

T A B L A N º 8

Recuperación de las proteínas solubles (% de las proteínas del extracto soluble).

	4-6 S	12 S	19 S	27 S	66 S (?)	Total recuperado
BOCIOSAS	82	7	9	-	5 .	93 %
CONTROLES	32	2	55	7 %	-	96 %

en el espectro en U.A. (Figura nº 37), con la misma salvedad indicada para las ratas C.

En la Tabla nº 8 se detallan las proporciones en que se recuperaron por gradiente de sacarosa cada uno de los componentes purificados, así como la recuperación proteica total. Como se ve, la recuperación proporcional de la 19 S en las ratas bociosas es unas seis veces inferior que en las ratas controles. La recuperación de 12 S es casi cinco veces superior en las bociosas que en las controles y por último, se ve que el componente proporcionalmente mayoritario de las ratas bociosas es el 4-6 S, mientras que en las ratas controles es el 19 S. Estas proporciones coinciden aceptablemente con las que pueden deducirse de los espectros en U.A. (Aunque debemos de tener en cuenta que, como se ve en U.A., lo que estamos valorando como 4 S está compuesto en realidad por dos bandas, una de ellas 6 S, que no hemos podido separar mediante el gradiente de sacarosa y cuya contribución al total no hemos valorado, pero como se ve, en la Figura nº 37, parece ser inferior al 50 %). Por este motivo al referirnos al pico IV obtenido en gradiente de sacarosa se le denomina 4-6 S.

3) Iodación de cada fracción purificada de las proteínas solubles de los dos grupos de ratas.

Como puede apreciarse en la Tabla nº 9, hay notables diferencias en el contenido glandular en I^{127} y en la iodación de las proteínas solubles, de los grupos de animales B y C. El contenido en yodo por glándula total es unas ochen-

T A B L A N O 9

Contenido en I^{127} de las glándulas, de sus extractos y de su grado de iodación de las proteínas tiroideas solubles purificadas.

	$\mu g I / glándula$	Extracto soluble $mg I / 100 mg prot.$	IODACION: $mg I / 100 mg proteína$				
			4-6 \pm	12 \pm	19 \pm	27 \pm	66 \pm (?)
BOCIOSES	0,34	0,004	0,003	0,016	0,062	-	0,1
CONTROLES	24,84	0,50	0,013	-	0,52	0,82	-

ta veces inferior en los animales bociosos que en los controles. La iodación porcentual del extracto de las proteínas solubles, es más de 100 veces inferior en los animales del grupo B que en los del grupo C. Asimismo, la iodación porcentual de cada una de las proteínas purificadas presenta diferencias notables. La iodación porcentual de la iodoproteína 12 S de las ratas controles no se pudo medir debido a la pequeñísima cantidad de esta proteína recuperada por gradiente de sacarosa. Por falta de cantidad suficiente del componente con un C.S. de 66 S tampoco pudo confirmarse que el grado de iodación indicado en la Tabla nº 9 sea correcto.

En esta tabla hay que destacar que la fracción recuperada con más grado de iodación de los animales C es la 27 S, y posiblemente la 66 S de los B. Además la 4-6 S, es la menos iodada en ambos grupos. Aunque en el caso de los animales B es ésta la proteína mayoritaria del extracto soluble del tiroides, es tan bajo su grado de iodación, que en la fracción 4-6 S de estos animales sigue habiendo una cantidad de iodo inferior a la encontrada en las otras fracciones. Este hallazgo está también de acuerdo con la poca radioactividad encontrada en esta fracción de proteínas.

E - Microscopía óptica.-

El aspecto histológico de los tiroides procedentes de cada grupo de animales experimentales estudiados puede verse en la Figura nº 40. Como se ve, los animales del grupo C muestran folículos tiroideos, amplios, con células

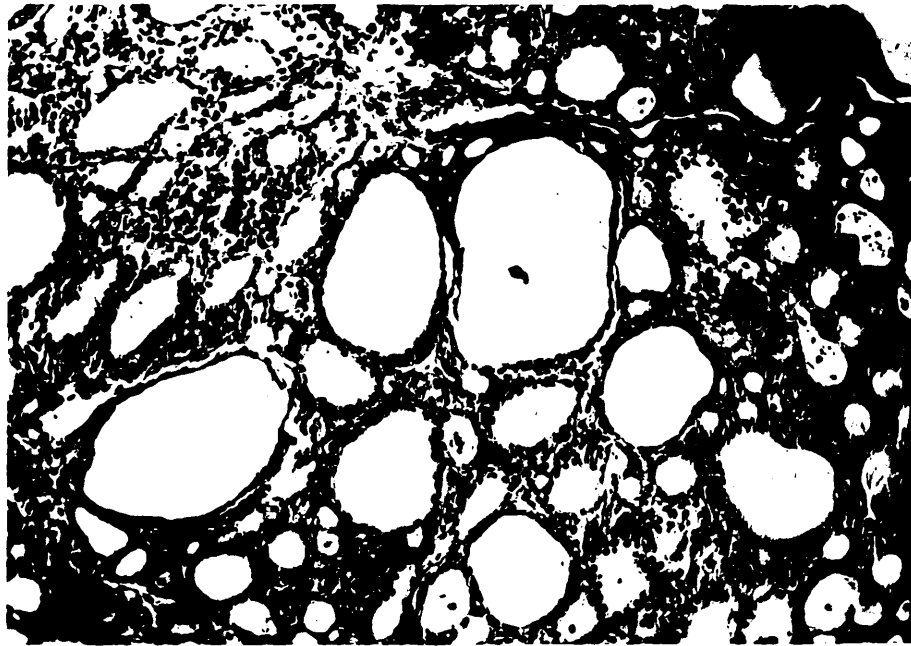


Figura nº 40-C.

Aspecto histológico al microscopio óptico del tiroides de las ratas controles (grupo C). Se ven unos folículos tiroideos amplios con gran contenido coloide y células foliculares normales que tienden a ser aplanadas.

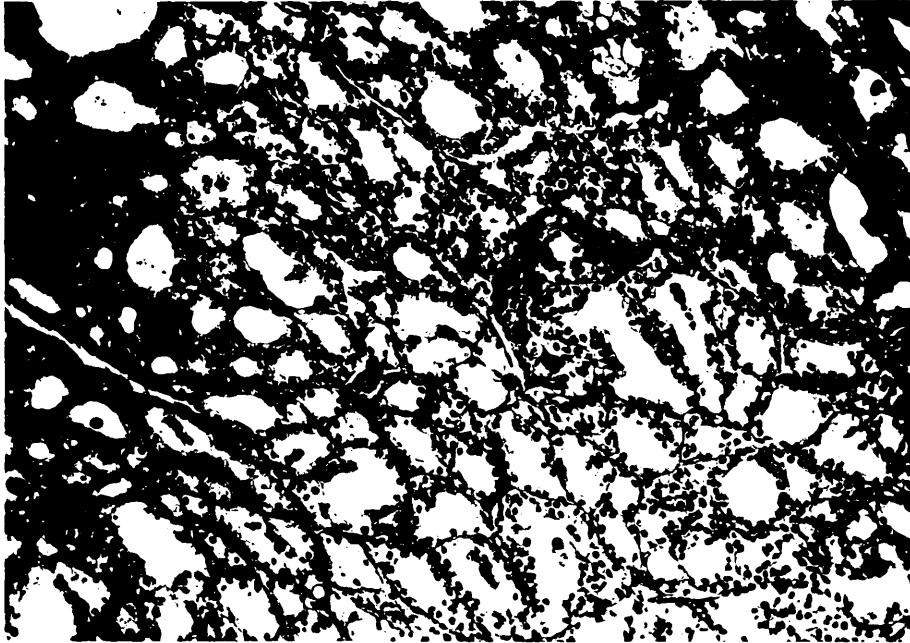


Figura nº 40-B.

Aspecto histológico al microscopio óptico de los tiroides de las ratas bociosas (grupo B). Se ven unos folículos tiroideos reducidos, con poco contenido coloide y células foliculares en mayor número y altura con respecto a los tiroides de las ratas controles (Fig. 40-C).

F - Resumen. -

La dieta pobre en iodo, a la que han estado sometidos durante 13 meses los animales del grupo B, ha producido en ellos los siguientes cambios, con respecto a los animales del grupo C alimentados con la misma dieta suplementada con iodo, hasta valores que se consideran normales para roedores:

1º.- El peso del tiroides ha aumentado 4 veces más en los animales bociosos que en los controles.

2º.- Un turnover acelerado del iodo, como se refleja en las curvas de captación de I^* por los tiroides y las cifras de IT^{131} y PBI^{131} en plasma obtenidos a las 24 h de administrar el trazador.

3º.- Una distribución intratiroidea del iodo -tanto estable (I^{127}) como radioactivo (I^{131})- incorporado a los diferentes iodocompuestos, que se caracteriza por un aumento en la proporción de iodo que se incorpora a la MIT sobre el que se incorpora a la DIT, así como un aumento de la proporción de iodo incorporado a la T_3 . A esto último, principalmente, se debe el que haya una relación T_3/T_4 aumentada. Se debe resaltar que, aunque los cocientes MIT/DIT y T_3/T_4 sean más altos en los animales bociosos que en los controles, las cantidades absolutas de todos los iodocompuestos, incluidos MIT y T_3 , son de 50-100 veces inferiores en los animales bociosos que en los controles.

4º.- Si bien está disminuida la proporción de la T_4 "libre" en plasma, no lo está la de la T_3 "libre", por este motivo la relación % de T_3 "libre" / % de T_4 "libre", está aumentada. La cantidad de T_4 total plasmática no presenta diferencias significativas entre ambos grupos de animales.

En conjunto, las proporciones de hormonas tiroideas circulantes en los animales bociosos, son suficientes como para que no haya diferencias ni en peso corporal ni en longitud, con respecto a los animales controles.

5º.- Aunque el peso de los tiroides de los animales del grupo B es unas cuatro veces superior al de los animales del grupo C, los niveles de TSH plasmático en el momento de sacrificar las ratas son iguales en ambos grupos de animales. Este dato, en apariencia paradójico, podría explicarse al considerar que, si a los tejidos periféricos de los animales del grupo B llegan cantidades de hormonas tiroideas suficientes como para que no dejen de crecer y poner peso, también llegarían a su hipófisis cantidades de hormonas tiroideas suficientes como para impedir una estimulación de la salida de TSH. Suponemos que en los animales del grupo B, durante alguna fase, de su prolongada dieta pobre en iodo, ha habido un aumento en los niveles de TSH circulante, como refleja su actual bocio. Pero este punto tendría que ser comprobado en investigaciones futuras.

6º.- Las diferencias encontradas en las proteínas solubles son muy notables. Hay una drástica disminución en la proporción de T. G. 19 S, debido a que, en las ratas del grupo B, el componente mayoritario (82 %) está en la fracción 4-6 S.

Además en este grupo de animales aparece un componente de un peso molecular, a juzgar por su C.S., mucho más alto que los conocidos hasta la fecha. Por ello los datos referentes a este nuevo componente deben de tomarse como aproximativos, y con las debidas reservas, hasta que en un nuevo estudio, pueda ser confirmada su aparición y se estudien de nuevo sus características. No conocemos en cuales otras situaciones experimentales aparecería, y para repetir la que en el presente trabajo se ha estudiado, necesitamos otros 13 meses.

7º.- El contenido en iodo estable (I^{127}), como era de esperar, es mucho más bajo en los animales bociosos que en los controles, no solo en cuanto al total por glándula, sino también en el grado de iodación de las proteínas solubles purificadas.

8º.- Morfológicamente se objetivó en el estado hiperfuncionante de los tiroides de las ratas del grupo B, pues se encontró una estructura en la que destaca la existencia de folículos pequeños, con escaso contenido coloide, un mayor número de células foliculares y de mayor altura que en los tiroides de las ratas C.

DISCUSSION

I - TIROIDES HUMANOS

A - Datos obtenidos en BMN-eumetabólicos, Ca, T. y B. Hipermetabólicos y B. congénito por falta de organificación del I^- .

1) Composición en iodoaminoácidos.

Los resultados principales se han resumido en las páginas 132 y 133.

Como puede verse en dicho resumen, al principio intentamos comparar los datos obtenidos en tiroides de enfermos con distinto estado metabólico con los datos descritos para tiroides de individuos eumetabólicos sin bocio por Ermans y Cols. (1968, a, b). Resultaba necesario obtener estos datos de la literatura por no haber conseguido nosotros un número adecuado de tiroides normales marcados con I^* . Hemos hecho referencia constante a estos estudios de Ermans y Cols. por ser los únicos publicados in extenso.

Los patrones de distribución porcentual del I^* entre los iodoaminoácidos marcados, obtenidos en todos los grupos de glándulas que hemos estudiado, difieren en uno o más aspectos del obtenido por los citados autores en glándulas normales. No creemos que todas estas diferencias se deban a que en nuestros casos se trate de la distribución porcentual del I^* y en los de Ermans y Cols. (1968, a, b) a distribución porcentual de I^{127} . Ermans y Cols. (1968, a, b) han determinado la actividad específica de los diferentes compuestos iodados a distintos tiempos después de inyectar el I^* . Encontraron que desde los tiempos más cortos estudiados (2 y 6 h.) la actividad específica de las iodotirosinas permanece constan-

te, mientras que la de las iodotironinas va aumentando progresivamente y tardaría semanas en hacerse constante. Por lo tanto creemos que nuestros valores porcentuales de MIT^* y DIT^* son comparables a los de MIT y DIT de Ermans y Cols., aunque haya que tener cierta precaución al comparar los de T_4^* y T_3^* nuestros con los de T_4 y T_3 de dichos autores.

En líneas generales se observaba que los cocientes MIT^* / DIT^* aumentaban progresivamente según el esquema siguiente:

B. Hipermatabólicos $>$ Normales $>$ BMN-eumetabólicos $>$ BMN-
└──────────(Ermans y Cols.)──────────┘
 -eumetabólicos.

En el caso del % de I^* encontrado como T_4^* se encontraba lo opuesto:

B. Hipermatabólicos $<$ Normales $<$ BMN- eumetabólicos $<$ BMN-
└──────────(Ermans y Cols.)──────────┘
 -eumetabólicos.

Considerando las salvedades que acabamos de hacer para las comparaciones entre los valores de T_4^* encontrados por nosotros y los de T_4 encontrados por Ermans y Cols. (1968, a, b), podemos sin embargo concluir que los B. hipermatabólicos contienen una mayor proporción de T_4 que las glándulas normales y los BMN-eumetabólicos. Con respecto al hecho de que nuestros BMN-eumetabólicos contienen menos proporción de I en forma de T_4 que los de Ermans y Cols. podría darse que esto se debiese, parcial o totalmente, al hecho de que estamos midiendo T_4^* y ellos midieron T_4 . Pero no creemos que esto sólo justificaría toda la diferencia, puesto que también son diferentes los datos MIT^* / DIT^* de nuestros BMN-eumetabólicos y los MIT / DIT de los BMN-eumetabólicos

de Ermans y Cols. Ya hemos indicado que en el caso de las iodotirosinas no hay que hacer las mismas salvedades que hacemos cuando intentamos comparar porcentajes de I^* e I^{127} en forma de iodotironinas.

A pesar de que se observaban claramente las tendencias indicadas, notamos también que la variabilidad de los valores obtenidos para MIT^* / DIT^* y $\%$ de T_4^* dentro de cada grupo de glándulas era tan grande, que a veces la diferencia entre los valores medios de los distintos grupos no resultaba estadísticamente significativa. Observamos que, en general, dentro de cada grupo las glándulas con valores de MIT^* / DIT^* más altos, eran las que tenían un valor más bajo de la iodación porcentual de la T.G. Al contrario, aquellos con iodación más alta eran los que daban valores más altos de $\%$ de T_4^* . Esto nos llevó a considerar la conveniencia de olvidarnos del estado metabólico del enfermo cuya glándula se estaba estudiando y representar los datos de distribución intratiroidea del I^* en función del grado de iodación: a) del tejido fresco y b) de la T.G. purificada.

No se encontró ninguna relación entre MIT^* / DIT^* y $\%$ de T_4^* en función del contenido en iodo por unidad de tejido fresco. Sin embargo, cuando se usó como variable independiente el grado de iodación de la T.G., matriz proteica en la que se forman las hormonas tiroideas, se encontró que era este un factor de primordial importancia en la distribución del I^* encontrada para cada glándula. De nuestra Figura nº 4, se deduce claramente que, sea cual sea la enfermedad que afecta al tiroides, la formación de T_4^* está en función del grado de iodación de la T.G. Lo mismo puede decirse de los co-

cientes $\text{MIT}^*/\text{DIT}^*$ (Figura nº 6). Hasta tal punto ocurre esto, que podemos concluir que la determinación de la distribución porcentual del I^* entre los diferentes iodoaminoácidos puede tomarse como una medida indirecta del grado de iodación de la T.G., en casos en que no se disponga de los equipos y técnicas químicas necesarias para su valoración directa.

Como puede observarse en las Figuras nº 4, 6 y 7, se vislumbra un nivel crítico de iodación de la T.G., de aproximadamente el 0,1 %, por debajo del cual las disminuciones de % de T_4^* y % de DIT^* son súbitamente más intensas. Pudiera ser que la relación entre % de I^* como T_4^* y % de iodación de la T.G. no fuese lineal, siendo la formación de T_4^* casi nula, hasta una iodación de la T.G. de aproximadamente el 0,1 %. A partir de este valor aumentaría bruscamente la proporción de T_4^* . Aunque el número de casos estudiados es insuficiente para comprobar ese punto, una relación de este tipo parece desprenderse de los estudios realizados por Ermans y Cols. (1968, a, b) en humanos y los realizados en animales experimentales por Inoue y Taurog (1968, a).

Por otro lado, no solamente se deduce de nuestra Figura nº 8 una relación directa precursor-producto entre DIT^* y T_4^* , sino también que en cuanto el % de DIT^* disminuye por debajo de unos determinados niveles no hay suficiente DIT^* como para acoplarse a T_4^* en cantidad apreciable. En nuestro estudio se observa un pequeño aumento del % de I^* en forma de T_3^* a medida que aumenta el grado de iodación de la T.G. En estas glándulas no hemos observado el aumento de la relación $\text{T}_3^*/\text{T}_4^*$ observado en tiroides de ratas al disminuir la iodación de la T.G. Tampoco lo encontraron Er-

mans y Cols. (1968, b).

Muy recientemente Rolland y Cols. (1971) han presentado una comunicación en la que describen el resultado obtenido tras la valoración de compuestos iodados estables en 75 tiroides humanos, obtenidos de enfermos con una gama variadísima de afecciones tiroideas. Indican que sea cual sea la naturaleza de la enfermedad (Hashimoto, Ca. T., bocios difusos hipotiroideos, bocios hipertiroideos, etc.), la composición en iodoaminoácidos es función del grado de iodación de la T.G.: Por debajo de un grado de iodación de la T.G. inferior al 0,1 % encuentran muy poco % de T_4 . Por encima de este nivel de iodación, el % de T_4 aumenta muy rápidamente. Como puede verse, esto está muy de acuerdo con la conclusión a la que hemos llegado con los datos aquí presentados obtenidos con I^* . Esta conclusión también está de acuerdo con los datos presentados en una comunicación de Camus (1971).

En cierto modo se puede comprender que con un nivel de iodación de la T.G. del 0,1 % o inferior, no se lleguen a formar suficientes moléculas de DIT como para que haya producción de T_4 . Considerando un nivel de iodación del 0,1 % y asumiendo para la T.G. un peso molecular de 650.000-670.000, cada molécula de T.G. contendría una media de 5 átomos de iodo. Considerando la distribución porcentual de dichos átomos de iodo entre los diferentes compuestos del tiroides, encontrada por nosotros y otros autores para ese nivel de iodación de la T.G., se deduciría que de esos 5 átomos de iodo, 3 estarían en forma de MIT y 1 en forma de DIT. En otras palabras, sólo una de cada 2 moléculas de T.G. contien-

dría una molécula de DIT, y sólo una de cada 4 moléculas de T.G., tendría las dos moléculas de DIT mínimas requeridas para el acoplamiento con formación de T_4 . Naturalmente, esto ocurriría en el mejor de los casos, o sea, cuando dichos 2 radicales DIT estuviesen espacialmente distribuidos de forma óptima para acoplarse. O sea, que incluso este razonamiento, muy simplificado, pone de manifiesto que el grado de iodación de la T.G. juega un papel muy importante en la reacción que conduce a la formación de T_4 .

Sobre los posibles mecanismos por los cuales un aumento de la iodación de la T.G. por encima del 0,1 %, resulte en un aumento considerable en la formación de T_4 , pueden formularse numerosas hipótesis. De entre ellas reciben en la actualidad bastante atención las siguientes: (DeGroot & Davis 1961, b; Edelhoich, 1962) Se piensa que en el folículo tiroideo solo un porcentaje muy pequeño de los radicales tiro-silo de la T.G., está en una situación estérica adecuada para incorporar I y que lo haría preferentemente en una sola de las posiciones orto con el grupo hidroxilo del fenilo. Por lo tanto para niveles bajos de I, los átomos de éste se van incorporando a estos radicales de la T.G., dando MIT. Una vez formada toda la MIT estéricamente posible, los átomos de I irían entrando en dichas moléculas con formación de DIT. Si esto ocurriese en unas moléculas de MIT con preferencia a otras, estéricamente más lejanas, se comprendería que un aumento en el % de DIT pudiese súbitamente resultar en una mayor eficiencia en la formación de T_4 . Pero además se ha demostrado que un aumento en la cantidad de iodo oxidante, resulta en la disminución de radicales SH libres de la T.G. con

aumento de los puentes S-S. Está claro que esto podría ayudar al acercamiento de radicales DIT, que estaban estéricamente alejados antes de que se formasen los puentes S-S, con la consiguiente considerable facilitación de la formación de T_4 .

Cualquiera que sean los mecanismos por los cuales el contenido en I de la T.G. influye tan notablemente en la eficiencia de la síntesis de la T_4 , sí podemos concluir de este estudio y de los realizados por otros (Ermans y Cols. 1968, a, b; Rolland y Cols. 1971 y Camus, 1971) que la composición de iodoaminoácidos, que se determina midiendo el % de I^* o el I^{127} en los diferentes compuestos de una glándula determinada, refleja el grado de iodación de la T.G. y no el tipo de proceso patológico que afecta a la glándula.

Lo que aun desconocemos es la causa que determina el que haya un grado menor de iodación de la T.G. en algunos procesos patológicos del tiroides, como los BMN-eumetabólicos. Este punto lo volveremos a discutir más adelante.

En lo referente al B. congénito por falta de incorporación del I^* a compuestos orgánicos la distribución del I^* en el tiroides, como se ha descrito, se caracteriza porque únicamente se encuentra en forma de I^* .

2) Proteínas solubles.

Se hace conjuntamente la discusión de las glándulas

de los pacientes nº 1 al nº 13, ambos inclusive, por estar en estrecha relación conceptual.

En todas estas glándulas, incluido por tanto uno de los dos B. congénitos estudiados en este trabajo, se han encontrado más o menos proteínas en el pico A después de la separación del E.S. en Sephadex G-200. Este pico A aparece en mayor o menor proporción relativa, con respecto a las proteínas separadas en los picos B y C. La variabilidad entre una glándula y otra en lo que respecta a estas proporciones relativas, parece depender de la mayor o menor hiperemia y de la mayor o menor celularidad. Así por ejemplo el pico B, que contiene en su mayor parte Hb., aparece en proporciones superiores a las de las glándulas normales en aquellos casos en los que se observó un gran contenido hemático intraglandular. El pico C, que contenía proteínas de un C.S. de 4 S, aparece en proporciones superiores a lo normal, en aquellas glándulas en las que estaba muy aumentada la proporción de células a coloide como podía objetivarse en la microscopía óptica. En ninguno de estos casos estudiados se encontró I^{*} incorporado a las proteínas eluidas en el pico C.

En todos los casos hubo un claro arco de precipitación cuando el contenido del pico A se puso a reaccionar frente a antisuero anti-T.G. humana normal. Esto indicaría que el mayor o menor contenido en iodo de esta glucoproteína, incluso la ausencia total del mismo, no va acompañado de cambios en los determinantes antigénicos de la misma; confirmamos así los trabajos de Metzger y Cols. (1962).

Los análisis en U.A. del pico A de la glándula del enfermo nº 13, demostraron que este pico contiene, como proteína mayoritaria un componente con un C.S. de 17,5 S y no contiene proteínas con un C.S. superior a éste. Se debe de recordar que, al contrario de lo observado en las glándulas de los pacientes nº 1 al nº 12, las proteínas eluidas en el pico A usando el E.S. salino de la glándula nº 13, no contenían I^* ni I^{127} . Como por otra parte, esta proteína 17,5 S mostró evidente reacción inmunológica frente a antisuero anti-T.G. humana normal (19 S), los datos arriba indicados muestran claramente que la T.G. humana tiene un C.S. de 17,5 S cuando no está iodada. Demostramos así lo previsto teóricamente por otros autores: De Crombrughe y Cols. (1967), utilizando T.G. pobremente iodada, procedente de bocios humanos, habían visto en U.A. y por gradientes de sacarosa, que la T.G. pobre en iodo tenía un C.S. inferior a 19 S y si ésta se iodaba "in vitro", el C.S. aumentaba hasta llegar a 19 S. Ellos calcularon matemáticamente que, la T.G. nativa en ausencia total de iodo tendría un C.S. de 17,25 S, valor muy próximo al encontrado por nosotros por medidas directas. Otros autores como Nunez y Cols. (1965) y Goldberg y Cols. (1965) e Inoue y Cols. (1968, a), también comprobaron, "in vitro" e "in vivo" que la T.G. nativa pobremente iodada procedente de tiroides de rata tiene un C.S. menor de 19 S y este C.S. se recupera al disponer la glándula nuevamente de iodo suficiente. Asimismo, y muy recientemente, Camus (1971) ha comunicado que los datos obtenidos en una serie de 28 glándulas humanas normales y bociosas, que la T.G. tenía un C.S. de 19 S siempre que su grado de ioda-

ción, que es precisamente el mismo por debajo del cual disminuye drásticamente la eficiencia en la formación de T_4 , va disminuyendo progresivamente el C.S. Por extrapolación, Camus llegó a la conclusión de que el C.S. de la T.G. no iodada sería de 17,5 S tal y como aquí hemos demostrado.

Es de mucho interés la observación de Camus (1971) según la cual un grupo de pacientes con bocio nodular, tratados con 2 mg. de IK 16 horas antes de la extirpación de la glándula, el C.S. de la T.G. era de 19 S, mientras que otro grupo de enfermos con bocio nodular, no suplementados con IK, el C.S. era inferior a 19 S, tal y como correspondía al bajo contenido en iodo de la misma. Estos resultados indican claramente que las posibles diferencias en el C.S. de la T.G. procedente de enfermos con diferentes afecciones tiroideas, su grado de iodación bajo no es el resultado de anomalías en la T.G. que impedirían la incorporación de iodo a dicha matriz proteica, puesto que tanto el grado bajo de iodación como el C.S. se normalizan al suministrar más iodo.

Teniendo solo 3 casos en los que el grado de iodación de la T.G. era inferior al 0,1 %, aparte del ya comentado con iodación del 0 %, no podemos comprobar, si la proteína mayoritaria del pico A obtenido por Sephadex G-200, tenía un C.S. de 19 S o algo inferior. Pero lo que si hemos observado consistentemente es la ausencia del componente 27 S en todos ellos. Queremos destacar que tampoco se encontró este componente, en el caso nº 13. Asimismo, Mouriz y Cols. (1970) han observado en 5 glándulas humanas, procedentes de

una zona endémica del Ecuador, como a medida que la concentración de iodo va decreciendo, disminuye a su vez la cantidad de 27 S recuperada en gradiente de sacarosa.

Estos datos son compatibles con el siguiente mecanismo de formación de los componentes de la T.G. que proponemos a continuación: en ausencia total de iodo, la síntesis de T.G. da como resultado la formación de un compuesto glucoproteico, cuyo C.S. es de 17,5 S con todas las características estructurales e inmunológicas iguales de la T.G. nativa (19 S). Por iodaciones sucesivas, este componente 17,5 S pasa a tener un coeficiente de sedimentación de 19 S, forma "madura" o T.G. "nativa". Estas iodaciones sucesivas de la 17,5 S van acompañadas de cambios en la distribución porcentual de iodoaminoácidos. Tanto el C.S. como los patrones de distribución del iodo entre los iodoaminoácidos, se hacen normales cuando la iodación llega a ser suficiente (superior al 0,1 % aproximadamente). Cuando la 19 S está altamente iodada en el folículo, su estructura se altera y se asocia para formar 27 S; el iodo, previamente oxidado, no solo se incorporaría a los residuos tirosílicos disponibles, sino que además oxidaría los grupos disulfuro ($-SH - SH-$), de forma que por esta oxidación se formarían puentes $-S - S-$ entre las cadenas de la 19 S. Esto facilitaría la agregación de estas cadenas a la forma 27 S. Recientemente Rall y Cols. (1971), al ver por medio de SDS-poliacrilamida que las T.G. 19 S y 27 S tienen subunidades del mismo peso molecular, apoyan con sus datos este mismo mecanismo y también ellos lo dan como cierto.

B - Datos obtenidos en un bocio congénito por defecto de síntesis de Tiroglobulina. -

1) Composición en iodoaminoácidos.

Del resultado de las cromatografías se deduce que el iodo se incorpora al menos a dos "compartimentos" diferentes como demuestra la gran discrepancia encontrada entre la distribución intratiroidea del iodo recién captado (I^*) y del iodo estable (I^{127}). La cromatografía correspondiente a la determinación de I^{127} pone de manifiesto la existencia de un "compartimento" en el cual una gran proporción del halógeno está incorporado a un compuesto (o compuestos) no hidrolizable(s) por pronasa, dando un patrón altamente anómalo de la distribución intratiroidea del iodo. El otro "compartimento" puesto de manifiesto por la cromatografía en la que se determinó la distribución del I^* , correspondería a un compuesto(o compuestos) más fácilmente hidrolizable(s) por pronasa, pero que es diferente del que habitualmente se encuentra en tiroides humanos, como se demuestra al considerar los puntos que siguen.

Tanto el "compartimento" reflejado en la cromatografía del iodo estable, como en el representado por la del I^* , la relación MIT / DIT es muy baja si se compara con las glándulas normales. Estos cocientes nos resultan aun más anormales considerando que también son muy bajas las proporciones de I^{127} e I^* en forma de T_4 y T_3 . En todas las demás glándulas humanas estudiadas aquí por nosotros y por otros autores ya citados, valores tan bajos de T_4 y T_3 van siempre

acompañados de cocientes MIT / DIT superiores a 1 - 1,5. O sea que los cocientes MIT / DIT encontrados en la presente glándula, no explicarían de suyo la bajísima eficiencia en la formación de T_4 y T_3 y ponen claramente de manifiesto que debe de haber algún otro defecto de importancia causal. En nuestra opinión es la falta de T.G. como substrato normal de la iodación, el factor causal de todas estas alteraciones en la distribución de iodoaminoácidos tiroideos.

No hemos encontrado en ninguno de los trabajos que revisamos de la literatura en glándulas humanas una proporción tan elevada de iodo en forma de un material no digerible por pronasa ("material en el origen"). En animales y bajo ciertas condiciones experimentales, ha sido descrito una proporción de I^{127} como "material en el origen" de alrededor del 50 % en hamsters por Van Middlesworth (1965, 1970) y en ratas por Kohler y Cols. (1971, a). Más recientemente estos últimos autores (Kohler y Cols. 1971, b) han identificado en sus animales un compuesto con comportamiento similar en Sephadex G-200 al de nuestro pico B, que es solo parcialmente hidrolizable por pronasa, hecho que atribuyen a que dicho compuesto tiene un alto contenido en carbohidratos. Las condiciones experimentales son tales que conducen a un vaciamiento del contenido de T.G. del tiroides y a un notable aumento de la celularidad. Ambas circunstancias se dan asimismo en el presente caso y sugieren la posibilidad de que tanto en el caso que estamos discutiendo como en los animales estudiados por Van Middlesworth y Kohler y Cols. aparecen como mayoritarios en la glándula componentes que también se encuentran en glándu-

las normales. Pero como en estas últimas el componente mayoritario es con mucho la T.G. (y sus congéneres), estos otros compuestos iodados tenderán a pasar desapercibidos.

No sabemos, por el momento, que características tiene en nuestro caso, el material resistente en tan alto grado a la digestión por pronasa, aunque tenemos trabajos en marcha encaminados a tal fin. Los resultados que se obtengan ayudarán a fundamentar o excluir la posibilidad que acabamos de indicar.

2) Proteínas solubles.

Como hemos visto en la introducción, la T.G. se caracteriza por ser específica del tiroides y su estructura va encaminada a facilitar al máximo la síntesis de las hormonas tiroideas. De los resultados obtenidos en este paciente se desprende que en su tiroides únicamente se está utilizando para la biosíntesis de las hormonas iodadas, un substrato (o substratos) diferentes(s) a cualquiera de las formas conocidas como T.G.

En U.A. se observa que el E.S. de esta glándula está formado por dos únicos componentes: uno 4 S y otro 6 S, faltando totalmente un componente 19 S. Al fraccionar el E.S. en Sephadex G-200, el patrón que se obtiene está formado en cambio por tres compuestos (excluyendo la Hb^x); los

^x La Hb tiene un C.S. de 3,98 S y emigra en la U.A. con el pico 4 S y está claro su origen hemático.

dos del pico B están marcados por el radioiodo administrado previamente, mientras que el pico C no lo está. Por el comportamiento en Sephadex G-200, que nos informa aproximadamente de los pesos moleculares de los componentes proteicos, pensamos que la primera porción del pico B es una 6 S y que la segunda porción del mismo pico es una 4 S. El pico C, aparece en el mismo volumen de elución que el pico C del bocio congénito nº 13 anteriormente descrito, y en éste el C.S. hallado fue de 4,2 S.

Creemos que esta discrepancia entre el espectro en U.A. del E.S. y el patrón obtenido en Sephadex G-200 se puede deber a que hay dos compuestos con igual C.S. de 4 S pero que se diferencian por: a) su forma y b) su iodación. La diferencia de forma justificaría su separación en Sephadex G-200 aunque los pesos moleculares y los C.S. sean del mismo orden. La diferencia de iodación se pone de manifiesto claramente al considerar que el I^{*} se incorpora a la 4 S del pico B y no a la del pico C.

Esta anomalía en la naturaleza del substrato sobre el que se verifica la hormonogenesis puede fácilmente ser la causante de la anomalía cinética de secreción del radioiodo captado por la glándula de nuestro paciente.

3) Estudios inmunológicos.

Nuestros estudios inmunológicos apoyan fuertemente

es sintetizado por el tiroides y que difiere en algunos aspectos de la albúmina sérica.

Ignoramos si la proteína 4 S que hemos detectado en gran proporción en nuestro enfermo es el mismo componente 4 S que aparece, en pequeña proporción en glándulas humanas normales. En el presente estudio no podemos documentar nada nuevo a favor o en contra de que esta proteína sea sintetizada en el tiroides o se trate de albúmina que procedente del plasma es iodada al pasar por la glándula.

4) Microscopía óptica y electrónica.

Otro hecho de este enfermo de gran interés es que la estructura del bocio revela al microscopio óptico unas características típicas de tiroides fetales: es decir una ausencia prácticamente total de folículos normales. Una interpretación es que este hecho podría ser debido a la atrofia de dichos folículos al faltar la T.G. componente fundamental del coloide folicular. La hiperestimulación celular de este bocio, que revela el examen al microscopio electrónico sería la expresión inmediata de la elevada cifra de TSH plasmático, objetivada en este enfermo por radioinmunoensayo.

5) Casos parecidos descritos en la bibliografía.

Proporciones similares de MIT, DIT y T_4 , junto con un contenido en iodo glandular no bajo, son las que se

han encontrado en un bocio llamado de "defecto de acoplamiento" descrito por Klevit y Cols. (1965). Basándose estos autores en las hipótesis de Stanbury (1963) consideraron la posibilidad de que casos semejantes se debiesen a:

- 1º) Deficiencia del hipotético "enzima acoplante".
- 2º) Alteraciones en la estructura de la T.G.
- 3º) Fallo total en la formación de T.G.

En nuestros datos se puede ver claramente que efectivamente puede darse en la realidad la tercera de estas posibilidades. En el enfermo descrito por Klevit y Cols. (1965) existen diversos indicios para pensar que era muy similar al nuestro. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados por nosotros no han sido hechos en el citado caso y por ello no tenemos base para afirmar que el defecto en ambos casos es idéntico.

Los bocios congénitos o dishormonogenéticos con alteraciones en las iodoproteínas se han clasificado últimamente por Stanbury y Cols. (1967) en dos tipos: Uno de ellos al que denominan "defecto de iodoproteína", se define a base de los siguientes criterios diagnósticos:

- 1º) Bocio e hipotiroidismo, generalmente desde la infancia.
- 2º) Captación alta de I^{131} por el tiroides y lento turnover del mismo.
- 3º) NEI (iodo no extraíble con butanol) en plasma superior al 20 %.
- 4º) Demostración de "iodoalbúmina" circulante en plasma.

Los mismos autores se preguntan si estas características son suficientes como para formar una entidad separa-

da.

El otro tipo, llamado "bocio por fallo de síntesis de tiroglobulina" está basado en los siguientes hallazgos:

1º) En un reducido número de pacientes con bocio e hipotiroidismo DeGroot y Cols. (1959), detectaron en el E.S. de sus glándulas un aumento más o menos grande de un componente 4 S con disminución paralela de T.G. Este componente 4 S formó arco de precipitación frente anti-albúmina sérica humana. En uno de estos pacientes la disminución en la proporción de T.G. era particularmente intensa.

2º) Falconer (1966) describió una raza de ovejas australianas con frecuente bocio congénito a causa del cual la mayoría de ellas morían en edades muy tempranas. Las que llegaban a la edad adulta presentaban bocio con concentraciones normales de hormonas tiroideas circulantes, detectándose en plasma además iodotirosinas y proteínas iodadas. En tiroides encontró únicamente dos proteínas solubles iodadas. Según este autor una de ellas es albúmina sérica iodada y la otra un componente 8-9 S que no precipitó con suero anti-T.G. Ambas iodoproteínas contenían hormonas en cantidad suficiente como para cubrir las necesidades de los animales. La conclusión principal que hace es que en estos animales hay una alteración genética para la síntesis de tiroglobulina.

3º) Van Zyl y Cols. (1965) y Robbins y Cols. (1966) en un grupo de animales bovinos africanos, han descrito un bocio congénito cuyo patrón de iodoproteínas solubles glandulares era el siguiente: 1.- Un componente muy poco iodado con un

C.S. de 3,75 S. 2.- Albúmina sérica iodada e IgG. 3.- Un componente 8,9 S que era el más radioactivo. 4.- Un componente 11,9 S que era el que presentaba el mayor grado de iodación química. En estos estudios y otros posteriores (Van Jaarsveld y Cols. 1971) no consiguieron que este último componente, que correspondería en C.S. a una proteína con peso molecular la mitad de la T.G. nativa, se asociara para formar 19 S.

4º) Por otro lado Lissitzky y Cols. (1967, 1968) describieron dos pacientes hermanos en los que concurrían todos los criterios diagnósticos mencionados para el "defecto de iodoproteína". Al estudiar la glándula encuentran que en el E.S. había poca T.G. 19 S, siendo la proteína predominante un componente de C.S. 4 S, que ellos identifican como albúmina sérica iodada sobre la base de criterios muy demostrativos (comportamiento electroforético e inmunológico y análisis de aminoácidos). En uno de los pacientes, encontraron un déficit de la actividad deshalogenasa para iodotirosinas marcadas, en cultivos de cortes de tiroides "in vitro". De sus datos concluyen: 1º.- Que el primario en sus pacientes fue la pérdida de la actividad deshalogenasa. 2º.- Como consecuencia de ello, y por mecanismos desconocidos, la albúmina sérica pasa al tiroides iodándose, y en parte pasa iodada a la circulación. 3º.- Aunque encuentran una cierta cantidad de T.G. 19 S consideran la posibilidad de que exista un defecto genético a nivel cistronómico para la síntesis de T.G.

Al microscopio óptico esta glándula mostraba, como

en nuestro caso, una estructura de los folículos tipo fetal. Al microscopio electrónico las células tiroideas, igual que en nuestros datos, mostraban una hiperestimulación de sus organelas del tipo de las que se ven tras la estimulación crónica con TSH.

El caso aquí descrito podría ser incluido en cualquiera de los tres tipos mencionados de la clasificación de Stanbury y Cols. (1967). Difiere en los descritos por Lissitzky y Cols. (1967, 1968) en que nuestro enfermo no tiene defecto alguno para la deshalogenación de las iodotirosinas.

En nuestra opinión, como ya mencionamos, nuestro enfermo padece un defecto congénito consistente en que las células tiroideas son incapaces de segregar tiroglobulina. Pero no hay anomalías en los diferentes pasos que llevan a la captación y la oxidación del yodo que, a falta de un sustrato normal se incorpora a otra proteína con características tipo albúmina sérica humana. Debemos hacer hincapié en el hecho de que es, por ahora, el único caso bien fundamentado que se ha descrito, de una falta total de T.G. en el E.S. de las proteínas solubles glandulares.

Los dos tipos de bocios congénitos con alteración de iodoproteínas de la clasificación de Stanbury y Cols. (1967), podrían incluirse en un solo grupo en el que el déficit de T.G. sería mayor o menor, incluso total como en nuestro caso. Estas diferencias podrían explicarse bien porque muchos de los casos descritos sean fenocopias, bien porque exista heterogeni-

dad genética para este defecto.

II - ANIMALES EXPERIMENTALES

La situación experimental a la que se ha llegado en los animales del grupo B, tiene, a nuestro juicio, un gran interés fisiológico y fisiopatológico, puesto que no se ha usado droga alguna. La única variante entre los animales bociosos y los controles ha sido una ingesta baja en iodo prolongada. Desde hace muchos años, se sabe que un déficit prolongado en iodo es un factor fundamental en la bociogénesis, tanto en animales como en seres humanos.

A pesar de lo baja y mantenida que ha sido la ingesta de iodo en las ratas del grupo B, éstas se han desarrollado normalmente para su edad tanto en peso como en longitud, aunque el peso del tiroides es cuatro veces mayor en las primeras. Las medidas de diversos metabolitos implicados directamente en el metabolismo intermediario, realizadas en estos animales por Montoya y Cols. (1971) han demostrado que no hay una diferencia significativa entre ambos grupos. Tampoco lo son los niveles de TSH circulante, ni los valores de PBI^{127} y T_4 total circulantes. Estas dos últimas determinaciones concuerdan entre sí a pesar de estar hechas en dos laboratorios diferentes y muy distantes.

La relación entre las proporciones circulantes de T_3 "libre" / T_4 "libre", está aumentada en los animales del grupo B, con respecto a los del grupo C. Este aumento se hace principalmente a expensas de que la proporción de T_3 "libre" es solo muy ligeramente inferior en el grupo B, mien-

tras que la proporción de T_4 "libre" es la mitad en este grupo con respecto al control, como puede verse en la Tabla nº 7.

En el tiroides las relaciones MIT / DIT y T_3 / T_4 están notablemente aumentadas en los animales del grupo B, con respecto a los del grupo C. Estos aumentos se hacen a expensas de que en los animales bociosos hay más MIT que DIT y más T_3 que T_4 .

Esto no quiere decir que hay más MIT y T_3 en aquellos que en los controles, puesto que hay mucho más de todos los iodoaminoácidos en los controles. Sino que en los animales bociosos la cantidad absoluta de T_3 por glándula es mayor que la de T_4 y que la de MIT es mayor que la de DIT, mientras que en los controles ocurre justo lo contrario.

Queremos insistir, de nuevo, en lo que se expresa gráficamente en la parte inferior de la Figura nº 35, con respecto a las cantidades absolutas de iodoaminoácidos en ambos grupos de glándulas. Cuando estos datos se expresan proporcionalmente (parte superior de la misma Figura) parece que hay más MIT y más T_3 y una ligera disminución de T_4 en los animales bociosos que en los controles. Sin embargo, al calcular la cantidad absoluta por glándula de cada iodocompuesto, se ve que hay más de 50 veces más MIT, más de 100 veces más T_4 , y más de 20 veces más T_3 en los animales controles que en los bociosos; esto se comprende fácilmente si nos fijamos en que el contenido de I^{127} por

es unas 80 veces superior en los animales controles que en los bociosos, y por tanto, imposible que estos últimos contengan más iodocompuestos que los otros, disponiendo de una cantidad de iodo muchísimo menor. Confirmamos con estos datos un hecho sobre el que han insistido Henninger y Cols. (1966) Inoue y Cols. (1968, a) y Lamas y Cols. (1971, b). Si insistimos en este punto es porque hay una gran confusión en la literatura, debida en gran parte a que muchas veces inconscientemente se han tomado valores porcentuales de MIT^* , DIT^* , T_3^* y T_4^* como expresión de cantidades de MIT, DIT, T_3 y T_4 .

Asimismo, las glándulas de los animales controles tienen unos folículos tiroideos con apreciable contenido coloide, en el que se almacena T.G. con un excelente grado de iodación, mientras que las glándulas de los bociosos tienen unos folículos con escaso contenido coloide y T.G. pobremente iodada. De aquí se deduce que los tiroides de estos últimos animales están segregando al plasma prácticamente la totalidad de las hormonas que fabrican. Esto se refleja asimismo en la cinética del radioiodo: los animales bociosos tienen un turnover muy acelerado. Gracias a todo esto los niveles de T_4 total y la proporción de T_3 libre son solo muy ligeramente inferiores a los de los controles.

Puede resultar inesperado que estos animales y los descritos por otros autores, sometidos a una deficiencia en iodo tan intensa que resulte incluso en una disminución del nivel de T_4 en plasma, sean metabólicamente eutiroides.

Pero no debe olvidarse el hecho de que a medida que disminuye el grado de iodación de la T.G., aumenta la proporción de iodo asequible que se encuentra como T_3 , en vez de T_4 . Esto contribuye notablemente a un mejor aprovechamiento del poco iodo disponible, ya que la T_3 contiene menos iodo que la T_4 , pero es de acción periférica más rápida y más intensa. Ya se ha indicado aquí que en estos animales hay evidencia de un aumento relativo de la proporción de iodo que se encuentra como T_3 , con respecto al que se encuentra como T_4 en tiroides y plasma.

Varios autores han llegado a esta misma conclusión en diversas situaciones experimentales cuyo resultado final fue un déficit de iodo en el tiroides (Bois y Cols., 1958, a, b; Leloup y Cols., 1965; Querido y Cols., 1957; Studer y Cols., 1965; Henninger y Cols., 1956; Inoue y Cols., 1968, a).

Hemos llegado a una situación experimental en los animales bociosos, en la que el iodo administrado en la dieta, aunque bajo, aun es lo suficiente como para que periféricamente los niveles hormonales mantengan a los animales sin alteraciones metabólicas y los valores de TSH sin diferencia con los controles. Como ya comentamos al exponer el resumen de estos datos, es de suponer que en alguna fase de su prolongada dieta pobre en iodo, ha habido un aumento de TSH, como refleja su actual bocio. Efectivamente, Studer y Cols. (1965), en ratas mantenidas a dieta pobre en iodo durante

7 semanas, han detectado, usando el bioensayo de McKenzie (1958), un aumento del TSH circulante que se inicia al día 7 y sigue aumentado al día 35. No han hecho valoraciones de este parámetro más que a estos dos tiempos citados, y con un método de valoración que ellos mismos opinan que es poco preciso.

Como acabamos de decir en nuestro estudio las determinaciones de TSH circulante, efectuadas al tiempo de sacrificio de los animales, (es decir, unos 400 días sometidos a dieta pobre en iodo), medidas por radioinmunoensayo, no han dado valores diferentes entre los animales bociosos y los controles.

Hay diversas hipótesis en la literatura que podrían justificar esta paradójica situación de bocio con cifras normales de TSH circulante:

1º) Que se llegue a un agotamiento para la síntesis y/o secreción de TSH en la hipófisis de estos animales.

2º) Que los tiroides con un contenido en iodo muy bajo, tengan una sensibilidad a la hormona tirotrópica aumentada, de forma que en esta situación cifras normales circulantes de esta hormona sean capaces de producir un estímulo, que no se ejerce sobre tiroides con contenido normal o alto en iodo

3º) Se ha pensado que el TSH sea absorbido y degradado por el tiroides y que en los bocios este proceso al efectuar-

se en mayor escala, se detecten valores circulantes aparentemente normales pero que en principio son altos.

4º) El TSH ha estimulado al tiroides de los animales bociosos, como mecanismo compensador a la dieta baja en iodo, hasta un grado tal, en que aprovechando este elemento al máximo, se produce la suficiente cantidad de hormonas tiroideas, como para que valores de hormona tirotrópica reviertan a la normalidad. Debido a la hiperplasia desarrollada durante la fase de estimulación por niveles altos de TSH, el bocio persistiría.

Como se ve en nuestros datos las hormonas tiroideas circulantes en los animales bociosos, son también suficientes como para que se mantengan en peso, longitud y metabólicamente sin diferencias con los controles. Por ello esta última posibilidad es la que pensamos como más probable en nuestra situación experimental. Un nuevo estudio, repitiendo las mismas condiciones experimentales aquí usadas y midiendo idénticos parámetros, a tiempos escalonados, esperamos que nos de nuevas luces sobre este problema.

En zonas de bocio endémico, en las que se había demostrado una deficiencia en iodo se han descrito, sujetos con bocio y cifras normales de hormonas tiroideas circulantes, Stanbury y Cols. (1954); De Visscher y Cols. (1961). Estos últimos autores, encontraron proporciones altas de T_3^* circulante por cromatografía en sueros de varios de estos casos.

Wahner y Cols. (1971), también en zona con endemia de bocio, han encontrado valores normales de TSH, medido por radioinmunoensayo, en sujetos con bocio. Asimismo, Delange y Cols. (1971) no han encontrado diferencias en los valores de TSH, usando el mismo método que los autores anteriores, entre individuos con y sin bocio de la misma región endémica. En estos dos últimos trabajos, todos los pacientes estudiados tenían cifras normales de PBI^{127} en plasma. Esta situación ya había sido definida por Stanbury y Cols. (1954) como de "bocio eutiroides". Muchos de estos "bocios eutiroides" de zonas de bocio endémico son multinodulares.

Diversos autores, como Butfield y Cols. (1966, 1968) y Adams y Cols. (1968), han encontrado valores altos de TSH, medido por radioinmunoensayo, en sueros de individuos residentes en zonas endémicas, pero todos ellos tenían valores muy bajos de PBI^{127} en plasma.

La situación en nuestros animales bociosos sería paralela al llamado "bocio eutiroides" descrito en zonas endémicas, aun cuando somos conscientes de que no se puede extrapolar por las buenas de los datos obtenidos en animales experimentales a sujetos humanos.

El diferente patrón de las proteínas solubles tiroideas, obtenido en los animales bociosos, con respecto a los controles, en lo referente al menor grado de iodación en cada componente purificado de los primeros, se explica perfec-

tamente por lo expuesto en párrafos anteriores.

Las distintas proporciones, de cada fracción proteica, recuperadas en uno y otro grupo las interpretamos de la siguiente manera:

1º) La baja proporción del componente 19 S^{*}, recuperada de las glándulas bociosas, la atribuimos, en primer lugar, a una degradación aumentada de este componente y, en segundo lugar, al aumento de la proporción recuperada del componente 4-6 S. Una degradación aumentada del componente 17-19 S, formaría parte del turnover acelerado puesto de manifiesto en los animales bociosos.

2º) Pensamos que los componentes 4-6 S, proporcionalmente mayoritarios en los animales bociosos están formados por proteínas celulares estructurales. Creemos que nada tienen que ver con los procesos biosintéticos de las hormonas tiroideas; para esto nos basamos en primer lugar en su grado prácticamente nulo de iodación y en segundo lugar en el aumentado número de células que se visualizan histológicamente en las glándulas de los animales bociosos. Es posible que los componentes 4-6 S sean proteínas celulares estructurales, pues se encuentran en proporción aumentada siempre que haya un aumento en el número y/o volumen de células en el ti-

* A este componente lo denominamos convencionalmente 19 S, aunque su C.S. real será entre 17-19 S. Este dato no lo hemos podido comprobar por no tener suficiente cantidad purificada de proteína, debido a su escasa proporción y al reducido número de glándulas bociosas de que disponíamos.

roides.

3º) Se sabe desde los trabajos de Rall y Cols. (1960), que el componente 12 S, que se obtiene al purificar proteínas solubles del tiroides, es un producto de degradación de la 19 S, y que la cuantía de esta degradación está en relación inversa con el grado de iodación de la 19 S. Por otro lado, los trabajos de Schneider y Edelhoch (1970), demostraron que la degradación de 19 S a 12 S, está en relación inversa con la temperatura a que se trabaja.

Rutinariamente, todos los experimentos de purificación de proteínas se hacen a una temperatura entre los 4-5°C. De forma que este último factor justifica la proporción de 12 S recuperada en las glándulas controles y los dos factores mencionados, actúan conjuntamente en las glándulas de los animales bociosos, justificando que la proporción recuperada de 12 S en ellos, sea mayor.

4º) El componente 66 S, obtenido de las glándulas de los animales bociosos, es mucho más alto que el mayor de los descritos hasta el momento. Su real C.S. estaría entre 60-70 S y su peso molecular sobrepasaría los dos millones. Como se ve, es el más altamente iodado químicamente de los obtenidos de las glándulas de los animales bociosos. Aunque, como ya hemos comentado, consideramos que los datos referentes a este compuesto no se pueden tomar como definitivos, hasta que en un nuevo estudio confirmemos su aparición y estudiemos de nuevo sus características.

De su significación fisiopatológica únicamente podríamos decir, que formaría parte, de alguna manera que desconocemos, de la adaptación de estos animales a la prolongada dieta baja en iodo a que han estado sometidos.

III - CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA FORMACION DE HORMONAS IODADAS EN EL TIROIDES

Como hemos visto a lo largo de nuestra exposición de los factores importantes para una síntesis eficiente y fisiológicamente adecuada de hormonas tiroideas, estos factores podrían englobarse en dos categorías de diferente naturaleza, según que su falta conduzca a defectos cuyas consecuencias puedan ser corregidas únicamente dando el producto final, las hormonas tiroideas (A) o dando una de las materias primas para la hormonogénesis, el yodo (B).

A - Las circunstancias esenciales para que pueda haber hormonogénesis son:

1) Que exista en el tiroides un sustrato proteico normal, sin T.G., no se forma T_4 en cantidades fisiológicamente adecuada, aunque haya oxidación del I^- e incorporación del mismo a otra proteína. Esto ha quedado claramente objetivado en nuestro bocio congénito nº 14.

2) Que los mecanismos de oxidación del I^- permanezcan intactos. Estos mecanismos podrían alterarse por las siguientes causas:

- a) Déficit de peroxidasa tiroidea.
- b) Déficit del sistema generador de H_2O_2

Sin un sistema que oxide eficientemente el I^- no se

puede formar T_4 aunque haya T.G. normal. Esto ha quedado claramente demostrado en el estudio de nuestro bocio congénito nº 13.

3) Que el proceso de hidrolisis de la T.G. por las proteasas específicas del tiroides se efectue normalmente. Como se sabe este proceso es imprescindible para que queden liberadas las hormonas tiroideas del substrato proteico donde se forman. Un defecto de este tipo es, por el momento, puramente hipotético, ya que no se ha descrito ningún caso.

En el estado actual de nuestros conocimientos, no se ve modo de corregir las consecuencias de uno cualquiera de los defectos que acabamos de indicar, más que dando al individuo afectado T_4 y/o T_3 .

B)-En el caso de que sean normales los factores indicados en A), el siguiente factor importante a tenerse en cuenta es la disponibilidad por el tiroides de iodo oxidado en cantidad adecuada a la cantidad de T.G. Puede llegarse a un déficit en la disponibilidad de iodo oxidado por uno o más de los siguientes mecanismos principales;

- a) Por una ingesta baja de iodo en la dieta.
- b) Por presencia de bociógenos en la dieta que dificulten la organificación del iodo (interfiriendo con su captación y/o oxidación) aunque la ingesta de éste

sea normal.

- c) Por fallo en los mecanismos de concentración del I^- por la membrana tiroidea.
- d) Por pérdidas intensas de iodo por falta de reutilización intratiroidea del mismo. Esto ocurre en el defecto enzimático definido como carencia de deshalogenasa de las iodotirosinas.

Nos parece oportuno exponer algunas consideraciones sobre los factores que se han englobado en las categorías A y B.

A - Factores fundamentales. -

El factor 1º se discutió ampliamente al considerar ampliamente nuestro enfermo nº 14, que, como ya se indicó, es el único caso descrito por el momento, en el que se aprecia una ausencia total de sustrato normal, T.G., en el extracto soluble del tiroides. Como allí se demostró, esto conduce a una total alteración de la hormonogénesis.

El factor 2º se ha considerado ya ampliamente en las discusiones sobre nuestro enfermo nº 13. En anteriores consideraciones pusimos ya de manifiesto cómo en ausencia de una oxidación intratiroidea del I^- no sólo no llegan a formarse T_4 y T_3 , sino que incluso la T.G. misma presenta anomalías, en cuanto a que no alcanza el grado de "maduración" (C. de S. 19 S) de la T.G. normalmente iodada.

Por ser por ahora meramente hipotético un defecto en los mecanismos de hidrólisis intratiroidea de la T.G., no vamos a hacer más referencia al factor 3º.

Es posible que llame la atención la anterior exposición de cuáles consideramos cómo puntos esenciales para que los mecanismos de oxidación del I^- permanezcan intactos (factor 2º). Se hace referencia explícita a un solo enzima tiroideo, la peroxidasa tiroidea, y a "un sistema generador de H_2O_2 ". Pensamos que resulta conveniente exponer aquí con más detalle lo que nos ha conducido a ello.

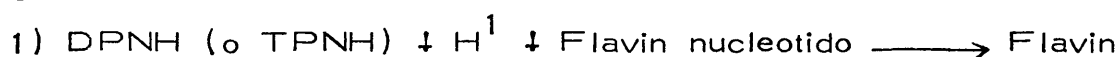
El mecanismo preciso de organificación del I^- dentro del tiroides ha sido objeto de controversia y aun no está esclarecido en todos sus puntos. La palabra organificación implica dos pasos secuenciales: el primero la oxidación del I^- y el segundo su incorporación a los radicales tirosílicos de la T.G. en posición orto con el hidróxilo del anillo fenólico. El primero de ellos, la oxidación del I^- , es un prerequisite indispensable para que se efectue el segundo, la incorporación del yodo. No sabemos cual es (o son) la forma (s) a la que el I^- es oxidado, lo que sí sabemos es que a su vez pasa a un estado muy reactivo y altamente oxidante.

Desde un principio se hizo notar que el modelo de reacción $2I^- \longrightarrow I_2 + 2e$ requiere un potencial redox de $\pm 0,535$ V, relativamente alto para la mayor parte de los sistemas redox biológicos. De entre los sistemas biológicos más usuales solo el H_2O_2 y el O_2 son oxidantes más fuertes que

el I_2 a pH 7. Por eso se implicó desde el primer momento, la existencia de una peroxidasa tiroidea. Esta idea se tomó en más seria consideración desde que Dempsey en 1944 presentó evidencia histoquímica de actividad peroxidasa en el tiroides. Recientemente Taurog (1970) obtuvo peroxidasa del tiroides en un alto grado de purificación y actividad biológica, caracterizándola como una glucoproteína con un peso molecular de 62.000, aproximadamente, y un punto isoeléctrico por debajo de 6,5. Este enzima en presencia de un sistema generador de H_2O_2 , I^- y un substrato proteico adecuado (como la T.G.) es capaz no solo de oxidar el I^- sino también de incorporarlo a los radicales tirosilo con formación de MIT, DIT, T_4 y T_3 .

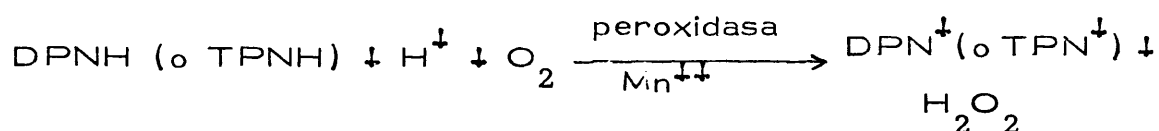
En los trabajos citados de Taurog (1970), en cuya publicación se hace una revisión exhaustiva de la bibliografía anterior, se pone de manifiesto en primer lugar, que hay efectivamente una peroxidasa en el tiroides y que ésta es específica de esta glándula. Ahora bien, esto implica que en el tiroides también tiene que haber H_2O_2 y por lo tanto una fuente generadora del mismo. Sobre este punto los conocimientos no son aun concluyentes. Se han propuesto principalmente dos esquemas hipotéticos cuya existencia fisiológica en el tiroides aun no ha sido demostrada.

El primero de ellos, sugerido por Schussler e Ingbar (1961) y por DeGroot y Davis (1962, b) supone lo siguiente:



nucleótido reducido \downarrow DPN $^{+}$ (o TPN $^{+}$).

2) Flavin nucleótido reducido \downarrow O $_2$ \longrightarrow Flavin nucleótido oxidado \downarrow H $_2$ O $_2$. El segundo esquema hipotético ha sido sugerido por Klebanoff y Cols. (1962) y supone que la peroxidasa actuaría en la generación de su propio peróxido de hidrógeno en un sistema generador Mn $^{++}$ -dependiente:



Como acabamos de indicar, Taurog ha demostrado que "in vitro" la peroxidasa por él purificada es capaz de catalizar el proceso biosintético completo que lleva a la formación de T $_4$ y T $_3$, siempre que la reacción de lleve a cabo en presencia de un sistema generador de H $_2$ O $_2$ y usando los dos substratos indispensables. Estos son I $^{-}$ y una proteína adecuada. La eficiencia en la formación de T $_4$ depende de la estructura de la proteína, de la cantidad del iodo oxidado y de la naturaleza del enzima peroxidante. El rendimiento máximo en T $_4$ se obtiene usando peroxidasa procedente del tiroides y T.G. como proteína substrato, siempre que la cantidad de iodo sea suficiente para un grado de iodación de la T.G. superior a 45 átomos de iodo por molécula de T.G. Usando peroxidasa tiroidea "in vitro", como substrato T.G. poco iodada, y iodo en cantidades adecuadas para que el sistema incorporase 45 átomos de iodo por molécula de T.G., Lamas y Cols. (1971, a) han conseguido que se formase una cantidad de T $_4$ comparable a la que se forma

"in vivo": más del 11 % del iodo incorporado a la T.G. estaba en forma de T_4 .

Por lo tanto, utilizando estos conocimientos recientes y otros anteriores, podemos llegar a la conclusión de que, incluso "in vitro", es suficiente un único enzima, la peroxidasa tiroidea, en presencia de un sistema generador de H_2O_2 , para la biosíntesis de T_4 y T_3 con eficiencia comparable a la que se obtiene "in vivo", siempre que se emplee T.G. como sustrato de la iodación y que para ésta haya una cantidad de iodo suficiente.

Mantenidas constantes las cantidades de T.G., de peroxidasa y de H_2O_2 generado, el factor limitante para la formación de T_4 y T_3 en cantidades comparables a las fisiológicas, es la cantidad de iodo incorporado a la T.G., o sea, su grado de iodación. Si ésta disminuye lo hace la proporción de iodo incorporado a la T.G. en forma de T_4 , con un progresivo aumento de la relación MIT / DIT. Para iodaciones muy bajas, prácticamente todo el iodo incorporado se encuentra como MIT.

A la luz de estos conocimientos, conviene volver a reconsiderar las bases sobre las que se propuso la existencia en el tiroides de dos enzimas hipotéticos: la tirosina-iodinasa (o iodotransferasa) y el enzima "acoplante".

La hipótesis sobre la existencia de la tirosina-iodinasa está basada en los trabajos de Fawcett y Kirkwood (1953

y 1954) y en los de Serif y Kirkwood (1958). En ellos se trataba de dilucidar los factores que intervenían en la síntesis "in vitro" de los iodoaminoácidos tiroideos. En sus sistemas estos autores utilizaban Cl_2Cu y homogenado de tiroides como agente oxidante, el aminoácido tirosina como sustrato a iodar, y I^* en cantidades traza. Con este sistema únicamente obtenían MIT^* . Basados en esto, postularon la existencia de un enzima, diferente a la peroxidasa, necesario para que la incorporación del iodo progresara más allá de la formación de MIT^* . El error fundamental de estos trabajos consiste en que al sistema añadieron I^{131} en cantidades traza (entre 10 y 20 μC) lo cual significa una cantidad insignificante de iodo químicamente reactivo (menos de 0,001 μg). Como más tarde se ha visto en los trabajos citados de Taurog (1970) y otros autores, con esta cantidad no hay suficiente iodo para formar el resto de los iodocompuestos tiroideos, ni siquiera usando como sustrato el que menos iodo requiere para una eficiente formación de T_4 : la T.G. Nótese que en los experimentos arriba indicados se utilizaba la tirosina como aminoácido libre, a pesar de que ya se había demostrado hacía años (Roche y Cols., 1949) que la presencia del enlace peptídico por el que este se incorpora a una proteína, favorece su iodación.

Desafortunadamente, este hipotético enzima, cuya existencia misma está basada en datos derivados de experimentos que a posteriori sabemos estaban mal conceptuados, recibió ulterior consideración debido a que Stanbury (1963), intentó explicar el síndrome de Pendred (1896), como una situación de

carencia congénita de dicho hipotético enzima. El síndrome de Pendred se caracteriza por bocio congénito con sordera con o sin leve hipotiroidismo. La captación del I^* es alta, y el I^* sólo se descarga parcialmente con ClO_4 o SCN^- . Considerando que en el caso de falta total de organificación del I^- , la descarga del I^* con ClO_4 o SCN^- es casi completa (véase por ejemplo nuestro paciente nº 13), y que en dichos casos se piensa que lo que falta es la peroxidasa tiroidea, Stanbury (1963) sugirió que en el síndrome de Pendred habría sólo una falta parcial de organificación, debida posiblemente a la falta de "tirosina-iodinasa", puesto que de faltar la peroxidasa la falta de organificación sería mucho más intensa.

Ahora bien, cabrían otras explicaciones sin involucrar la existencia de una "iodinasa". Por ejemplo, podría ser una falta parcial de peroxidasa en individuos heterocigóticos con respecto a un defecto de peroxidasa o podría tratarse de algún defecto en el sistema generador de H_2O_2 o en la proteína aceptora (T.G.). Posibilidades estas dos últimas que el mismo Stanbury sugiere como más probables que la falta de una hipotética iodinasa. Pero muchos autores parecen haber interpretado estas meras sugerencias de Stanbury como pruebas de que existe una tirosina-iodinasa.

Estudios posteriores indican que la T.G. de bocios obtenidos en enfermos con síndrome de Pendred es normal en cuanto puede inferirse a partir de su comportamiento inmunológico y de su C. de S. en U.A. Se sabe que es una T.G. muy poco iodada. La posibilidad de que la T.G. del síndrome

de Pendred es anormal, y que dificulta con ello la incorporación del iodo, no parece, pues, probable. Pero aun no se han realizado estudios encaminados a refutar o comprobar las otras dos posibilidades aquí apuntadas: que se trate de un defecto parcial de peroxidasa tiroidea o de una deficiencia en el sistema generador de H_2O_2 .

La falta congénita de un hipotético enzima "acoplante" fue postulada por Stanbury y Cols. (1955) en un paciente en el que encontraron una relación $MIT^* \downarrow DIT^* / T_3^* \downarrow T_4^*$ elevada en homogenados de tiroides. Este paciente tenía PBI plasmático normal y un gran bocio desde la infancia. Plantean la posibilidad de la falta de un enzima "acoplante", al encontrar iodotirosinas marcadas y prácticamente nada de iodotironinas marcadas, a pesar de que el contenido en I^{127} glandular parecía normal. Dicho contenido en iodo era de 17,8 mg / 100 g, cifra que, si bien puede parecer normal considerada globalmente, está francamente disminuida si se considera expresada en μg por g. de glándula (178 μg / g). Hay que tener en cuenta que en aquellos años no se conocía cuáles eran los valores normales expresados de este modo. En el área de Bruselas, Ermans y Cols. (1968, a) han obtenido en 10 glándulas normales valores de 620 ± 198 d.s. μg de I / g de tejido fresco y es sabido que en este área las disponibilidades de iodo son menores que las habituales en E.E.U.U.

En otra publicación Stanbury y Cols. (1963) llegan al diagnóstico de idéntico déficit en enzima "acoplante" en otro paciente, de cuya glándula estudian una biopsia. Encuentran unos

cocientes $\text{MIT}^* / \text{DIT}^*$ entre 1,6 y 2,1 y un porcentaje del I^* en la zona de la tiroxinas inferior al 2 %; el contenido en I^{127} fue de 36,3 μg por g. de tejido fresco y el patrón obtenido en U.A. del E.S. de las proteínas tiroideas, reveló un porcentaje mayoritario en la zona de la 19 S. Como hemos visto en nuestros resultados, estos datos sugieren fuertemente la existencia de una T.G. pobremente iodada por debajo del 0,1 %, en la cual no hay yodo suficiente como para llegar a unas proporciones normales de iodotiroxinas. Por lo tanto, no parece necesario implicar la falta de existencia de un enzima "acoplante". En nuestra opinión, pues, el problema se reduciría en estos casos a comprender porqué la T.G. está tan pobremente iodada. Es la misma pregunta que nos volvemos a formular más adelante al considerar los BMN-eumetabólicos.

Como hemos visto ampliamente en las consideraciones precedentes, habiendo T.G., sistema generador de H_2O_2 y peroxidasa tiroidea, el yodo oxidado juega un papel esencial en la formación de T_4 y T_3 y durante este paso final de su formación ("reacción de acoplamiento", aun no explicada del todo) tiene lugar un proceso de "maduración" de la proteína sustrato, la T.G., que no sabemos si es causal o consecuente a la formación de T_4 y T_3 .

B - Alteraciones en la disponibilidad de iodo oxidado en el tiroides.

Solo vamos a discutir aquí los mecanismos a) y b) puesto que, aunque no hay nada demostrado palpablemente, es sospecha de muchos autores que tengan algo que ver en la patogenia de los B.M.N. eumetabólicos. Como ya hemos indicado, el hecho central que hemos hallado en ellos es un bajo grado de iodación de la tiroglobulina que explica la empobrecida síntesis de hormonas tiroideas por gramo de tejido. Asimismo, otro hecho notable es una dilución del iodo en un volumen aumentado de la glándula que hace que su concentración sea baja expresada por gramo de tejido, aunque considerando el peso total glandular el contenido en iodo sea normal.

Los otros dos mecanismos corresponden a alteraciones congénitas que han sido descritas en la literatura y de las que no aportamos aquí ningún nuevo caso. Pero debe de recordarse que todos ellos tienen un denominador común que conduce a la falta de iodo oxidado. Por este motivo y considerando que no hay ninguna alteración de la proteína substrato, ni del sistema oxidante del I^- , pueden llegar a corregirse las consecuencias de cualquiera de estos fallos mediante un aporte de iodo mayor.

a) Ingesta baja de iodo en la dieta.

Este ha sido el mecanismo utilizado por nosotros, pa-

ra provocar los resultados descritos en los experimentos con ratas que aquí aportamos.

En humanos existen muy pocas dudas acerca de que la deficiencia en iodo de la dieta es un factor importante en la producción de hiperplasia tiroidea. En este sentido, ya desde hace tiempo el bocio se considera como un esfuerzo compensador de la glándula, en orden a proporcionar una cantidad suficiente de hormonas tiroideas en dicha situación de deficiencia en iodo de la dieta. (Stanbury, 1954).

Sorprendentemente, sin embargo, no se conoce exactamente la cantidad media de iodo que necesita un individuo normal para mantenerse como tal. Por medidas indirectas diversos autores han fijado esta cantidad entre 100-200 μg / día (Wayne y Cols. 1964; Greenwald, 1955). Otros autores como Voughth y London (1964) han encontrado que sujetos sanos ingerían durante seis semanas una dieta que oscilaba por su contenido en iodo entre 18 y 1540 μg / día; Malvaux y Cols. (1969) han hallado unas cifras medias del orden de 30 μg / día en individuos adolescentes que vivían en el área de Bruselas. A la vista de estos datos se puede concluir que no se conoce con certeza cuál es la cantidad diaria óptima de iodo para un sujeto sano.

Habitualmente la severidad de la deficiencia en iodo se ha basado en la medida de la excreción urinaria del mismo. De Crombrugghe y Cols. (1963) han estudiado 17 enfermos con B.M.N. eumetabólico y en ellos encontraron una excre-

ción urinaria de iodo baja, junto con una captación del radioiodo por el tiroides elevada, dato este último que coincide con lo hallado también por nosotros. Ellos concluyen de estos estudios que la deficiencia en iodo parece jugar un papel importante en la patogenia del B.M.N. eumetabólico. Pero posteriormente London y Cols. (1965) y Vough y Cols. (1965) han hallado que no existe correlación entre la ingesta de iodo y la excreción urinaria del mismo.

Por otro lado estudios efectuados por Vough y London (1967) confirmados por Malvaux y Cols. (1969) han revelado que en un número de individuos, al tiempo de la observación, el balance de iodo era negativo; esto indica: 1º) que para hacer estudios de balance de iodo en seres humanos se necesitarían meses, sino años, para que la observación pueda tener un valor absoluto, y 2º) que estos periodos de balance negativo de iodo en tiroides normales, que son capaces de almacenar hormonas en periodos de aporte adecuado, no suponen necesariamente una situación crítica para la formación de bocio. El problema, pues, sigue en pie, ya que aun no sabemos si estas oscilaciones tienen o no algún papel desencadenadamente o de mantenimiento en el B.M.N. eutiroides.

Como vemos, tal y como están los conocimientos en este sentido, no hay datos fehacientes para saber si una ingesta baja en iodo, presente o previa al desencadenamiento que conduce al desarrollo de B.M.N. eutiroides explica el hecho central hallado en nuestros B.M.N. eumetabólicos esporádicos: su bajo grado de iodación de la T.G. Aunque co-

mo ya hemos indicado en nuestros B.M.N. eumetabólicos el contenido total en iodo de la glándula es normal, estando únicamente disminuido si lo expresamos en $\mu\text{g} / \text{g}$. de tejido fresco. Esto último indica que hay una dilución del iodo en un aumentado peso de la glándula. Pero esto no nos indica si la dilución del iodo en una glándula de mayor volumen es una consecuencia más de la hiperplasia o su causa. En este último caso, seguiríamos sin saber qué factor estimuló inicialmente el crecimiento glandular. Estamos, pues, por ahora, ante un problema parecido al tan conocido de "la gallina y el huevo".

b) Presencia de bociógenos en la dieta.

Estas sustancias se han implicado frecuentemente en la bociogénesis humana, habiéndose propuesto la intervención de una gran variedad de ellas para explicar la empobrecida síntesis de hormonas tiroideas, que hay en las glándulas afectadas de B.M.N. eumetabólico, y por consiguiente el desarrollo del bocio, (Clements, 1957; Peltola, 1960 y 1970; Kilpatrick, 1961; Ermans y Cols., 1969). Pero la mayoría de estos datos se han obtenido en animales experimentales y no se conoce, por ahora, cómo estas sustancias bociógenas jugarían un papel en el desarrollo del bocio humano.

En definitiva no conocemos cuál es el proceso primario que desencadena el desarrollo del B.M.N. eumetabólico y que daría lugar a los hallazgos a los que nos hemos referi-

do, tal y como una dilución intraglandular del iodo y una baja iodación de la T.G., que explicarían la empobrecida síntesis de hormonas tiroideas por la glándula. A pesar de ello y a expensas de una hiperplasia de la misma, ésta llega a producir la suficiente cantidad de hormonas para que los individuos se mantengan eumetabólicos.

Otro mecanismo que se está considerando con creciente interés se basa en la demostración de la existencia de factores microbianos (Pastan y Macchia, 1967; Macchia y Cols, 1967). Estos autores del *Clostridium perfringens* han aislado una sustancia que actúa como estimuladora del tiroides, mimetizando en algunos aspectos fundamentales al TSH. De esta forma es posible que en algunas ocasiones los mecanismos a) y b) puedan actuar conjunta o separadamente, sobre glándulas que ya estaban previamente estimuladas por una sustancia independiente del TSH o estimulador tiroideo fisiológico. Serían estos factores los responsables de la hiperplasia inicial de la glándula que, unido a factores del tipo a) y/o b) llevarían a una dilución del iodo intraglandular y a una baja iodación de la T.G. Esta posibilidad se está tomando más seriamente en consideración desde que Vough y London (1967) encontraron que el alto grado de contaminación microbiana de algunos pozos de las aldeas de la zona de Virginia era el único factor que se podía relacionar con una alta frecuencia de bocio en las familias que los utilizaban. Este mecanismo microbiano aunque posible, aun no ha sido demostrado de manera fehaciente que ocurra en seres humanos, siendo otro mecanismo más a considerar teóricamente junto con los mecanismos a) y b) en la patogenia de los B.M.N. eumetabólicos.

CONCLUSIONES

A - De los estudios realizados en glándulas humanas.-

1) Composición en iodoaminoácidos.

De los datos obtenidos en los BMN-eumetabólicos y Ca.T. y B. congénito n^o 13, podemos concluir que los patrones de distribución del I^{*} entre los iodoaminoácidos marcados difieren en uno o más aspectos de los obtenidos en glándulas normales por Ermans y Cols. (1968, a, b), observándose, con las salvedades que hemos hecho en la Discusión, lo siguiente:

En lo referente a los cocientes MIT^* / DIT^* estos aumentan progresivamente según el esquema siguiente:

B. Hipermetabólicos > Normales > BMN-eumetabólicos > BMN-eu-
 └─ Ermans y Cols. ─┘
 metabólicos.

En el caso del % de I^* encontrado como T_4^* se encuentra lo opuesto:

B. Hipermetabólicos < Normales < BMN-eumetabólicos < BMN-eu-
 └─ Ermans y Cols. ─┘
 metabólicos.

Podemos pues concluir que los B.Hipermetabólicos contienen una mayor proporción de T_4 que las glándulas normales y los BMN-eumetabólicos.

No se encontró ninguna relación entre MIT^{*} / DIT^{*}

y % de T_4^* en función del contenido en iodo por unidad de tejido fresco. Sin embargo, cuando se usó como variable independiente el grado de iodación de la T.G., matriz proteica en que se forman las hormonas tiroideas, se encontró que es éste un factor de primordial importancia en la distribución del I^* encontrada en cada glándula. De nuestros datos se deduce claramente que, sea cual sea la enfermedad que afecta el tiroides, la formación de T_4^* está en función del grado de iodación de la T.G. Lo mismo puede decirse de los cocientes MIT^* / DIT^* . Hasta tal punto ocurre esto, que podemos concluir que la determinación de la distribución porcentual del I^* entre los diferentes iodoaminoácidos, puede tomarse como una medida indirecta del grado de iodación de la T.G., en casos en que no se disponga de los equipos y técnicas químicas necesarias para su valoración directa. Cualquiera que sean los mecanismos por los cuales el contenido en I de la T.G. influye tan notablemente en la síntesis de la T_4 , sí podemos concluir de este estudio y de los realizados por otros autores (Ermans y Cols., 1968, a, b; Rolland y Cols., 1971; Camus, 1971) que la composición de iodoaminoácidos que se determina midiendo el % de I^* o el I^{127} en los diferentes compuestos de una glándula determinada, reflejan el grado de iodación de la T.G y no el tipo de proceso patológico que afecta a la glándula.

Como puede observarse en nuestros datos se vislumbra un nivel crítico de iodación de la T.G. del 0,1 % aproximadamente por debajo del cual las disminuciones de % de T_4 y % de DIT^* son súbitamente más intensas. Pudiera ser que

la relación entre $\%$ de I^* como T_4^* y $\%$ de iodación de la T.G. no fuese lineal, siendo la formación de T_4^* casi nula, hasta una iodación de la T.G. de aproximadamente el 0,1 $\%$. A partir de este valor aumentaría bruscamente la proporción de T_4^* .

Por otro lado, no solamente se deduce de nuestros datos una relación precursor-producto entre DIT^* y T_4^* , sino también se ve, que, en cuanto el $\%$ de DIT desciende por debajo de unos determinados niveles, no hay suficiente DIT^* como para acoplarse a T_4^* en cantidad apreciable. En nuestro estudio se observa un pequeño aumento del $\%$ de I^* en forma de T_3^* a medida que aumenta el grado de iodación de la T.G. En estas glándulas humanas no hemos encontrado el aumento de la relación T_3^* / T_4^* observando en tiroides de ratas al disminuir la iodación de la T.G. Tampoco lo encontraron Ermans y Cojs. (1968, b).

Lo que aun desconocemos es la causa que determina que haya un grado menor de iodación de la T.G en algunos procesos patológicos de tiroides, como los BMN-eumetabólicos. En ellos se encuentra una disminución del contenido en I^{127} , expresado por g de tejido fresco, aunque el contenido total, considerando el peso total de la glándula, puede ser normal. Los posibles mecanismos por los que se puede llegar a esta situación han sido ya discutidos por otros autores sin llegarse a conocer cuál o cuáles son los más involucrados. Los presentes datos tampoco aclaran este punto.

En el caso del B. congénito por falta de incorpora-

ción del I^{-*} a compuestos orgánicos, la distribución del I^{*} en el tiroides, se caracteriza porque únicamente se encuentra en forma de I^{-*} .

En el caso del B. congénito por defecto de síntesis de T.G., se ha encontrado que el iodo se incorpora a dos "compartimentos" diferentes, por lo menos. Esto queda claramente demostrado por la gran discrepancia encontrada entre la distribución intratiroidea del iodo recién captado (I^{*}) y del iodo estable (I^{127}). La cromatografía correspondiente a la determinación del I^{127} pone de manifiesto la existencia de un "compartimento" en el cual una gran proporción del halógeno está incorporado a un compuesto (o compuestos) no hidrolizable (s) por pronasa, dando un patrón altamente anómalo de la distribución intratiroidea del iodo. El otro "compartimento", puesto de manifiesto por la cromatografía en la que se determinó la distribución del I^{*} , correspondería a un compuesto (o compuestos) más fácilmente hidrolizable(s) por pronasa, pero que es diferente del que habitualmente se encuentra en tiroides humanos, como se demuestra al considerar los puntos que siguen.

Tanto el "compartimento" reflejado en la cromatografía del iodo estable como en el representado por la del I^{*} la relación MIT / DIT es muy baja si se compara con la de las glándulas humanas normales. Estos cocientes nos resultan aun más anormales, si consideramos que también son muy bajas las proporciones de I^{127} e I^{*} en forma de T_4 y T_3 . En todas las demás glándulas humanas estudiadas aquí por nosotros

y por otros autores ya citados, valores tan bajos de T_4 y T_3 van siempre acompañados de cocientes MIT / DIT superiores a 1-1,5 y, por tanto muy superiores a los normales. O sea, que los cocientes MIT / DIT encontrados en la presente glándula no explicarían de suyo la bajísima eficiencia en la formación de T_4 y T_3 y ponen claramente de manifiesto que debe de haber algún otro defecto de importancia causal. En nuestra opinión es la falta del substrato normal de la iodación la T.G., el factor causal de todas estas alteraciones en la distribución de iodoaminoácidos tiroideos. Proporciones similares de MIT, DIT y T_4 , junto con un contenido en iodo glandular no bajo, son las que se han encontrado en un bocio llamado por "defecto de acoplamiento" descrito por Klevit y Cols. (1965). Basándose en las hipótesis de Stanbury (1963), considerando la posibilidad de que hubiera un fallo total en la formación de T.G., posibilidad que nosotros hemos demostrado claramente en nuestro caso, por primera vez en la literatura.

2) Proteínas solubles.

En lo referente a las glándulas de todos los pacientes estudiados (menos el bocio congénito por falta de T.G.), el pico A aparece en mayor o menor proporción relativa con respecto a las proteínas separadas en los picos B y C. Esto depende de la mayor o menor hiperemia y de la mayor o menor celularidad, respectivamente.

En todos los casos hubo un claro arco de precipitación cuando el contenido del pico A se puso a reaccionar

frente a antisuero anti-T.G. humana normal. Esto indica que el mayor o menor contenido en iodo de esta glucoproteína, incluso la ausencia total del mismo (como en el caso del bocio congénito por falta de incorporación del I^* a proteínas, caso nº 13), no va acompañado de cambios en los determinantes antigénicos de la misma.

Los análisis en U.A. del pico A de la glándula del enfermo demostraron que este pico contiene, como proteína mayoritaria un componente con un C.S. de 17,5 S y no contiene proteínas con un C.S. superior a éste. Al contrario de lo observado en las glándulas de los pacientes nº 1 al 12 las proteínas eluidas en el pico A de la glándula del paciente nº 13, no contenían I^* ni I^{127} . Estos datos muestran claramente que la T.G. humana tiene un C.S. de 17,5 S cuando no están iodada. Otro dato de mucho interés es la ausencia total de componente 27 S en el pico A de dicho enfermo. De aquí se dedujo la posibilidad de que la T.G. tiene que estar normalmente iodada y con coeficiente 19 S, para polimerizarse a 27 S. La ausencia total de dicho componente 27 S en los picos A de los tres pacientes con BMN-eutiroideo cuya T.G. estaba muy pobremente iodada (iodación inferior al 0.1 %), apoyan fuertemente esta hipótesis.

Estos datos son compatibles con el siguiente mecanismo de formación de los componentes de la T.G. que proponemos a continuación: En ausencia total del I, la síntesis de T.G. da como resultado la formación de un compuesto glucoproteico, cuyo C.S. es de 17,5 S con todas las carac-

terísticas estructurales e inmunológicas iguales que la T.G. nativa (19 S) al aumentar la iodación este componente 17,5 S pasa a tener un coeficiente de sedimentación de 19 S, forma "madura" o T.G. "nativa". El aumento de la iodación de la 19,5 S va acompañado de cambios en la distribución porcentual de iodoaminoácidos. Tanto el C.S. como los patrones de distribución del iodo entre iodoaminoácidos se hacen normales cuando la iodación llega a ser superior al 0,1 %, aproximadamente. Por debajo de este grado de iodación la eficiencia en la formación de T_4 y T_3 es muy baja. Por encima aumenta bruscamente hasta valores idóneos para las necesidades del organismo. Cuando la 19 S está altamente iodada en el folículo, su estructura se altera y se asocia para formar 27 S; el iodo, previamente oxidado, no solo se incorporaría a los residuos tirosílicos disponibles, si no que además oxidaría los grupos disulfuro (-SH -SH-) de forma que por esta oxidación se formarían puentes -S - S - entre las cadenas de la 19 S. Esto facilitaría la agregación de estas cadenas a la forma 27 S, siendo pues dependiente del grado de iodación esta polimerización.

De los resultados obtenidos de la glándula del paciente con aumento de T.G. (nº 14) demostramos que en su tiroides únicamente se está utilizando para la biosíntesis de las hormonas iodadas, un substrato (o substratos) diferente(s) a cualquiera de las formas conocidas de la T.G. En U.A. se observa que el E.S. de esta glándula está formado por 2 únicos componentes: uno 4 S y otro 6 S, faltando totalmente un componente 19 S o uno 27 S. por el comportamiento del

E.S. de esta glándula obtenido en Sephadex G-200 existen en ella dos compuestos con igual C.S. de 4 S, pero que se diferencian por su forma y por su iodación.

Los estudios inmunológicos del E.S. de este paciente así como los criterios de ultracentrifugación analítica ya expuestos, apoyan fuertemente la idea que su anomalía primaria es un defecto congénito que consiste en una incapacidad de sus células tiroideas de sintetizar tiroglobulina. En su ausencia se iodan ávidamente otros substratos distintos. Uno de ellos tiene movilidad y determinantes antigénicos comunes con albúmina sérica humana normal. Es este caso el primero descrito en el que se demuestra, con criterios bien fundamentados, una ausencia de T.G. en patología tiroidea humana. Esta glándula muestra unas características morfológicas (al microscopio óptico y electrónico) típicas de un tiroides humano fetal en fase precoloide, es decir, una ausencia prácticamente total de folículos normales. Una interpretación de este hecho sería que, al faltar la T.G., componente fundamental del coloide folicular, no se llegarían a formar los folículos. Esta interpretación estaría de acuerdo con la derivada por Shepard (1968) de sus estudios sobre desarrollo embriológico del tiroides humano. La hiperestimulación celular de este bocio sería la expresión inmediata de la elevada cifra de TSH plasmática medida por radioinmunoensayo.

B - De los estudios realizados en animales experimentales. -

En los animales bociosos hemos llegado a una

situación experimental, en la que el iodo administrado en la dieta, aunque bajo, aun es suficiente para que periféricamente los niveles hormonales mantengan a los animales sin alteraciones metabólicas y con valores de TSH iguales a los de los controles. Tanto en tiroides como en plasma, la relación entre las proporciones de T_3 / T_4 está aumentada en los animales bociosos con respecto a los animales controles y este aumento se hace principalmente a expensas de la proporción de T_3 . La situación observada en nuestros animales bociosos sería paralela a la encontrada en el bocio eutiroides (Stanbury, 1954) descrito en zonas de bocio endémico. Sin embargo como sabemos lo peligroso que puede ser extrapolar datos obtenidos en animales experimentales a sujetos humanos, no hemos derivado ninguna conclusión ulterior de esta semejanza. Interpretamos de la siguiente manera las distintas proporciones de cada fracción proteica recuperadas de cada grupo de los E.S.

1) La baja proporción del componente 17 - 19 S sería debida a una degradación aumentada en este componente y además, a un aumento de la proporción relativa del componente 4 - 6 S, que es el predominante en los animales bociosos. Pensamos que este componente 4 - 6 S está formado por proteínas celulares estructurales que nada tienen que ver con los procesos biosintéticos de las hormonas tiroideas. Para esta conclusión nos basamos en primer lugar en su grado, prácticamente nulo, de iodación y en segundo lugar, en el aumentado número de células que se visualizan histológicamente en las glándulas de los animales bociosos.

2) El aumento de la proporción del componente 12 S observado en las glándulas de los animales bociosos es el producto de la aumentada degradación de la 17-19 S en esta situación experimental. Se debe fundamentalmente al mayor grado de disociación durante procesos de purificación de la T.G. poco iodada.

3) El componente 66 S, obtenido de las glándulas de los animales bociosos, tiene el C.S. más alto que los descritos hasta el momento. Su C.S. real estaría entre 60-70 S y su peso molecular sobrepasaría los dos millones. Como ya hemos comentado en la discusión, consideramos que los datos referentes a este compuesto no se pueden tomar como definitivos, hasta que en un nuevo estudio confirmemos su aparición y estudiemos de nuevo sus características. De su significación fisiopatológica únicamente podríamos decir que formaría parte, de alguna manera que desconocemos, de la adaptación de los animales bociosos a la prolongada dieta baja en iodo a la que han estado sometidos.

Como hemos visto ampliamente en las consideraciones generales sobre la formación de hormonas iodadas en el tiroides, expuestas en la discusión, podemos concluir que para que haya síntesis apreciable de hormonas tiroideas deben existir ineludiblemente T.G. y un sistema oxidante del iodo. Dadas estas condiciones ineludibles, la presencia de iodo oxidado, en cantidades adecuadas es el factor más importante para que la síntesis de hormonas tiroideas sea eficiente. A la vista de los conocimientos actuales no es necesario implicar

la intervención de otros enzimas tiroideos, que por el momento son puramente hipotéticos, tales como la "iodinasa" y el "enzima acoplante". Durante el paso final de la formación de T_4 y T_3 ("reacción de acoplamiento", aun no explicada del todo) tiene lugar un proceso de "maduración" de la proteína sustrato, la T.G. dependiente, a su vez, del grado de iodación de la T.G.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, D.D., Kennedy, T.H., Choufoer, J.C. y Querido, A.J. Clin. Endocr., 28, 685, 1968.
- Barrington, E.J.W. Hormones and Evolution. The English University Press Ltd. 102 Newgate Street. London EC-1 1964.
- Bauman, E.Z. Physiol. Chem., 22, 1, 1895.
- Beckers, C. y de Vischer, M. Metabolism, 10, 695, 1961.
- Beckers, C. Tesis doctoral. Ed. Arscia. Bruselas, 1963.
- Benotti, J. y Benotti, N. Clin. Chem., 9, 408, 1963.
- Bois, J. y Larson, L.G. Acta Endocr., 29, 102, 1958, a.
- Bois, J. y Larson, L.G. Acta Endocr., 28, 262, 1958, b.
- Buttfield, I.H., Black, M.L., Hoffman, M.J., Mason, E.K., Wellby, M.E., Good, B.F. y Hetzel, B.S. J. Clin. Endocr., 26, 1201, 1966.
- Buttfield, I.H., Hetzel, B.S. y Odell, W.D. J. Clin. Endocr., 28, 1664, 1968.
- Camus, M. Abstracts 4th Meeting of the European Thyroid Association, Berna, 1971, pág. 26.
- Cavalieri, R.R., Searle, G.L. y Rosemberg, L.L. Endocrinology, 86, 10, 1970.
- Chervenka, C.H. En A manual of methods for the analytical

- ultracentrifugue. Beckman Ed. California, pág. 45, 1969.
- Clements, F.W. Med. J. Austral., 2, 645, 1957.
 - De Crombrughe, B., Beckers, C. y De Visscher, M. Acta Endocrinologica, 42, 300, 1963.
 - De Crombrughe, B., Edelhoach, H., Beckers, C. y De Visscher, M. J. Biol. Chem., 81, 118, 1964.
 - De Crombrughe, B., Pitt-Rivers, R. y Edelhoach, H. J. Biol. Chem., 241, 2766, 1966.
 - De Crombrughe, B., Edelhoach, H., Beckers, C. y De Visscher, M. J. Biol. Chem., 242, 5641, 1967.
 - De Groot, L.J. y Carvalho, J. J. Clin. Endocr., 20, 21, 1960.
 - De Groot, L.J. y Davis, A.M. J. Biol. Chem., 236, 2009, 1961, a.
 - De Groot, L.J. y Davis, A.M. Endocrinology, 69, 695, 1961, b.
 - De Groot, L.J. y Davis, A.M. Biochim. Biophys. Acta, 59, 581, 1962, a.
 - De Groot, L.J. y Davis, A.M. Endocrinology, 70, 492, 1962, b.
 - Delange, F., Hermans, J.M. y Ermans, A.M. J. Clin. Endocr., 33, 261, 1971.
 - Dempsey, E.W. Endocrinology, 34, 27, 1944.
 - De Nayer, P., Weathers, R. y Robbins, J. Endocrinology, 81, 118, 1967.

- De Visscher, M., Beckers, C., Van den Schrieck, H.G., De Smet, M., Ermans, A.M., Galperin, H. y Bastenie, P. A. J. Clin. Endocr., 21, 175, 1961.
- Edelhoch, H. J. Biol. Chem., 235, 1326, 1960.
- Edelhoch, H. J. Biol. Chem., 237, 2778, 1962.
- Edelhoch, H. Recent. Progr. in Horm. Res., 21, 1, 1965.
- Edelhoch, H. y Steiner, R.F., Biopolymers, 4, 999, 1966.
- Edelhoch, H. y Perlman, R.L. J. Biol. Chem., 243, 2008, 1968.
- Ermans, A.M., Kinthaert, J., Delcroik, C. y Collard, J. J. Clin. Endocr., 28, 169, 1968, a.
- Ermans, A.M., Kinthaert, J. y Camus, M. J. Clin. Endocr., 28, 1307, 1968, b.
- Ermans, A.M., Thilly, C. y Delange, F. En J.B. Stanbury ed. Endemic Goiter. PAHO Scientific Publication nº 193, pág. 101, 1969.
- Falconer, I.R. Biochem. J., 100, 190, 1966.
- Falconer, I.R. Abstracts of the 6th International Thyroid Conference. Viena, 1970, pág. 66.
- Fawcett, D.M. y Kirkwood, S. J. Biol. Chem., 205, 795, 1953.
- Fawcett, D.M. y Kirkwood, S. J. Biol. Chem., 209, 249, 1954.
- García, M.D. y G. Morreale de Escobar. Proc. 6th International Thyroid Conference. Viena, pág. 141, 1970.

- Gardner, J.V., Hayles, A.B., Woolner, L.B. y Owen, C.A. J. Clin. Endocr., 19, 638, 1959.
- Goldberg, I.H. y Seed, R.W., Biochem. Biophys. Res. Commun, 19, 615, 1965.
- Gorbman, A. y Bern, H.A. A Textbook of Endocrinology. Jhon Wiley and Sons Inc. New York, London, Sydney, 1962.
- Greenwald, Y. Amer. J. Clin. Nutr., 3, 215, 1955.
- Haibach, H. Endocrinology, 88, 149, 1971.
- Haddad, H.M. y Sidbury, J.R. J. Clin. Endocr., 19, 1446, 1959.
- Harington, C.R. Biochem. J., 20, 293, 1926.
- Harington, C.R. Biochem. J., 20, 300, 1926.
- Harington, C.R. y Barger, J. Biochem. J., 21, 169, 1927.
- Harington, C.R. y Randal, S.S. Biochem. J., 23, 373, 1929.
- Harington, C.R. y Pitt-Rivers, R. Biochem. J., 39, 157, 1945.
- Heninger, R.W. y Albright, E.C. Endocrinology, 79, 309, 1966.
- Herrera, E., Escobar del Rey, F. y G. Morreale de Escobar. Acta Endocrinologica (Kbh), 59, 529, 1968.
- Herrera, E., Escobar del Rey, F. y Morreale de Escobar, G. Current Topics in Thyroid Research. Proc. of the fifth International Thyroid Conference. Academic Press. New York,

- London, pág. 259, 1965.
- Hosoya, T.Y., Kondo, Y. y Ui, N. J. Biochem. (Tokio), 52, 180, 1962.
 - Hutchison, A. y McGuire, E. Endocrinology, 14, 869, 1954.
 - Ingbar, S.H. y Woeber, K.A. En Textbook of Endocrinology. Editado por Williams, R.H., Saunders, Co. Philadelphia, London, Toronto. Cuarta edición, pág. 105, 1968.
 - Inoue, K. y Taurog, A. Endocrinology, 83, 279, 1968, a.
 - Inoue, K. y Taurog, A. Endocrinology, 83, 816, 1968, b.
 - Jackson, A.D.M. Arch. Dis. Child., 29, 571, 1954.
 - Jonckheer, M.H. y Karcher, B.M. J. Clin. Endocr., 32, 7, 1971.
 - Jorgensen, E.C. Mayo Clinic. Proc., vol. 39, pág. 560, 1964.
 - Kagan, I.G. y Norman, L. Amer. J. Trop. Med. and Hig., 10, 727, 1961.
 - Kendall, E.C. Thyroxine American Chemical Society. Monograph series, nº 47, pág. 265, 1954. Chemical Catalog Co. Inc. New York.
 - Kilpatrick, R., Broadhead, G.D., Edmonds, C.J., Munro, D. S. y Wilson, G.M. Adv. in Thyroid Research, 273, 1961.
 - Klebanoff, S.J., Yip, C. y Kessler, D. Biochim. Biophys. Acta, 58, 563, 1962.
 - Klevit, H.D., Walter, R.E. y Bongiovani, A.M. J. Clin. Endocr., 25, 585, 1965.

- Kohler, H., Haeberli, A., Binswanger, Ch., Von Gruening, C. y Studer, H. *Acta Endocrinologica*, 67, 216, 1971, a.
- Kohler, H., Haeberli, A., Binswanger, Ch., Von Gruening, C., Bürgi, H. y Studer, H. 4th Meeting of the European Thyroid Association, Abstracts, pág. 26, 1971, b.
- Lachiver, F. y Leloup, H. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)*, 241, 573, 1955.
- Lamas, L., Dorris, M. y Taurog, A. 47th Meeting of the American Thyroid Association, Birmingham (Alabama), Abstracts, pág. 66, 1971, a.
- Lamas, L. y Morreale de Escobar, G. *Acta Endocrinologica*, (en prensa), 1972.
- Leloup, J. y Lachiver, F. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)*, 241, 509, 1955.
- Lissitzky, S., Codacciani, J.L., Cartouzon, G. y Mante, S. *J. Clin. Endocr.*, 24, 305, 1964.
- Lissitzky, S., Codacciani, J.L., Bismuth, J. y Depieds, R. *J. Clin. Endocr.*, 27, 185, 1967.
- Lissitzky, S., Bismuth, J., Codacciani, J.L. y Cartouzou, G. *J. Clin. Endocr.*, 28, 1797, 1968.
- London, W.T., Doutras, D.A., Pressman, A. y Vough, R.L. *J. Clin. Endocr.*, 25, 1091, 1965.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, L.J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.

- Macchia, V., Vates, R.W. y Pastan, I. J. Biol. Chem., 242, 3726, 1967.
- Malvaux, P., Beckers, C. y De Visscher, M. J. Clin. Endocr., 29, 79, 1969.
- Martin, R.G. y Ames, B.N. J. Biol. Chem., 236, 1372, 1961.
- Mayberry, W.E. y Astwood, E.B. J. Biol. Chem., 275, 2977, 1960.
- McGuirr, E. y Hutchison, B. Lancet, 1, 1117, 1953.
- McKenzie, J.M. Endocrinology, 63, 372, 1958.
- Metzger, H., Gordon, C.S. y Edelhoch, H. Biochemistry, 1, 205, 1962.
- Michel, R., Rall, J.E., Roche, J. y Tubiana, M. J. Clin. Endocr., 24, 352, 1964.
- Montoya, E., Castro, M., y Herrera, E. 5º Congreso Nacional de Bioquímica, Resúmenes. Comunicación nº 107. Barcelona, Junio, 1971.
- Morreale de Escobar, G., Llorente, P., Jolin, T. y Escobar del Rey, F. Biochem. J., 88, 526, 1963.
- Mouriz, J. Comunicación personal de trabajos efectuados en Boston, 1966.
- Mouriz, J., Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F. Endocrinology, 79, 757, 1966.
- Mouriz, J., y Stanbury, J.B. Canad. J. Biochem., 46, 51, 1968.

- Mouriz, J., Riesco, G. y Usobiaga, P. J. Clin. Endocr., 29, 942, 1969.
 - Mouriz, J., Fierro-Benitez, R. y Stanbury, J.B. Z. Ges. Exp. Med., 152, 1, 1970.
 - Nunez, J., Mauchamp, J., Macchia, V. y Roche, J. Biochim Biophys. Acta, 107, 247, 1965.
 - Otten, J., Jonckheer, M. y J. Dumont. J. Clin. Endocr., 32, 18, 1971.
- Oswald, A. Z. Physiol. Chem., 27, 14, 1899.
- Pastan, I., y Macchia, V. J. Biol. Chem., 242, 5757, 1967.
 - Peltola, P. Acta Endocrinologica (Kbh), 34, 121, 1960.
 - Peltola, P. y Krusius, F.E. The sixth International Thyroid Conference. Viena, Abstracts, pág. 27, 1970.
 - Pittman, C.S. y Pittman, J.A. Amer. J. Med., 40, 49, 1966.
 - Pitt-Rivers, R. y Harington, C.R. Biochem. J., 43, 223, 1948.
 - Pitt-Rivers, R., Hubble, D. y Hoather, W.H. J. Clin. Endocr., 17, 1313, 1957.
 - Pitt-Rivers, R. y Trotter. Editores, The Thyroid gland. Vol. I. London. Butterworths, 1964.
 - Querido, A., Schut, F., y Terpstra, J. Ciba Found. Colloquia on Endocrinology, 10, 124, 1957.
 - Rall, J.E., Robbins, J. y Edelhoch, H. Ann. New York Acad. Sci., 86, 373, 1960.

- Rall, J.E., Billstad, J., Edelhoeh, H., Lippoldt, R. y Salvatore, G. 4th Meeting of the European Thyroid Association. Abstracts, pág. 17. Berna, Septiembre, 1971.
- Remington, R.E. y Levine, H.J. J. Nutr., 11, 343, 1936.
- Remington, R.E. y Levine, H.J. J. Nutr., 13, 323, 1937.
- Rolland, M., Montfort, M. y Valenta, L. 4th Meeting of the European Thyroid Association. Abstracts, pág. 27, Septiembre, Berna, 1971.
- Robbins, J., Wolff, J. y Rall, J.E. Endocrinology, 64, 37, 1959.
- Robbins, J., Van Zyl, A. y Van der Walt, K. Endocrinology, 78, 1213, 1966.
- Robbins, J. y Rall, J.E. Physiological reviews, vol. 40, nº 3, pág. 415, 1960.
- Roche, J., Michel, R., Lafon, M. y Sadhu, D.P. Biochim. Biophys. Acta, 3, 648, 1949.
- Roche, J. y Michel, R. Recent Progr. in Horm. Research, 12, 1, 1956.
- Rosemberg, L.L., Goldman, M. y Roche, J. Fed. Proc., 23, 2, 1964.
- Rosemberg, L.L. y Cavalieri, R.R. Endocrinology, 84, 1322, 1969.
- Salvatore, E.G., Vecchio, G. y Sena, L. Atti Della Società Italiana di Patologia. Instituto per la diffusione di Opere Scientifiche. Milan, pág. 594, 1969.

- Schneider, R.A.B. y Edelhoeh, H. 3rd Meeting of the European Thyroid Association. Abstracts, pág. 56, Atenas, Mayo, 1969.
- Schneider, R.A.B. y Edelhoeh, H. J. Biol. Chem., 245, 885, 1970.
- Schneider, R.A.B. y Edelhoeh, H. 4th Meeting of the European Thyroid Association, Abstracts, pág. 28, Berna, Septiembre, 1971.
- Serif, G.S. y Kirkwood, S. J. Biol. Chem., 233, 109, 1958.
- Schussler, G.G. y Ingbar, S.H. J. Clin. Invest., 40, 1394, 1961.
- Schultz, A., Flink, E.B., Kennedy, B.J. y Zieve, J. J. Clin. Endocr., 17, 441, 1957.
- Shepard, T.H. Gen. Comp. Endocr., 10, 174, 1968.
- Shulman, S., Rose, N. y Witebsky, E. J. Immun., 75, 291, 1955.
- Shulman, S., Rose, N. y Witebsky, E. Fed. Proc., 16, 433, 1957.
- Shulman, S., Mates, G. y Bronson, P. Biochim. Biophys. Acta, 147, 208, 1967.
- Spiro, R.G. J. Biol. Chem., 240, 1603, 1965.
- Sterling, K. Recent. Progr. in Horm. Res., vol. 26, 249, 1970.
- Stanbury, J.B. y Hedge, A.N. J. Clin. Endocr., 10, 1471, 1950.

- Stanbury, J.B., Brownell, G.L., Riggs, D., Perinetti, H., Itoiz, J. y del Castillo, E.B. Endemic Goiter and the adaptation of man to iodine deficiency. Cambridge, Mass. Harvard University Press, 1954.
- Stanbury, J.B., Ohela, K. y Pitt-Rivers, T. J. Clin. Endocr., 15, 54, 1955, a.
- Stanbury, J.B., Kasenaar, A.A.H., Meijer, J.W.A. y Terpstra, J. J. Clin. Endocr., 15, 1216, 1955, b.
- Stanbury, J.B. y Janssen, M.A. J. Clin. Endocr., 22, 978, 1962.
- Stanbury, J.B., Riccabona, G. y Janssen, M.A. Lancet, April, 27, 917, 1963, a.
- Stanbury, J.B. Recent Progr. in Horm. Res. Academic Press inc. New York, 19, 547, 1963, b.
- Stanbury, J.B. En Stanbury, J.B., Wyngaarden J.B. and Fredickson D.S. (Eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York, pág. 215, 1966.
- Stanbury, J.B. y DeGroot, L.J. Clin. Chem., 13, 542, 1967.
- Studer, H. y Greer, M.A. Acta Endocrinologica, 49, 610, 1965.
- Taurog, A. Mayo Clinic Proceed., vol. 39, nº 8, pág. 569, 1964.
- Taurog, A. Recent Progr. in Horm. Res. Academic Press, Inc. New York, vol. 26, 189, 1970.
- Tong, W. y Chaicoff, I.L. Biochem. Chem., 232, 939, 1958.

- Turner, C.D. General Endocrinology. W.B. Saunders Co. Philadelphia. London, 1965.
 - Utiger, R.D. J. Clin. Invest., 44, 1277, 1965.
 - Van Jaarsveld, P.P., Sena, L., Van der Walt, B. y Van Zyl, A. 6th International Thyroid Conference. Abstracts, pág., 65, Viena, 1970.
 - Van Middlesworth, L. Proc. Radiois. in An. Nutr. and Physiol. International Atomic Energy Agency, Viena, 557, 1965.
 - Van Middlesworth, L. y Murphy, W.A. Metabolism, 19, 773, 1970.
 - Van Zyl, A., Schulz, K., Wilson, B. y Pansegrow, D. Endocrinology, 76, 353, 1965.
- Von Mutzenbacher, P. Ztschr. Physiol. Chem., 261, 253, 1939.
- Vough, R.L. y London, W.T. Amer. J. Clin. Nutr., 23, 1218, 1964.
 - Vough, R.L. y London, W.T. J. Clin. Endocr., 27, 913, 1967.
 - Vough, R.L., London, W.T. y Stebbing, G.E.T. J. Clin. Endocr., 27, 1381, 1967.
 - Wahner, H.W., Mayberry, W., Gaitan, E. y Gaitan, J.E. J. Clin. Endocr., 32, 491, 1971.
 - Warburg, J. y Kaplan, E. En Methods in Enzymology, by Colowick S.P. and Kaplan, Ill. 454. 1957.
 - Wayne, E.D., Koutras, D.A. y Alexander, W.D. Clinical

aspects of iodine Metabolism. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1964.

- Wolff, J. En Biochemical Disorders in Human Disease. Ed. by Thompson, R.H.S., Wootton I.D.P. and Churchill, A. 104 Gloucester Place London, pág. 379, 1970.